

Opinnäytetyö (AMK)

Bio- ja elintarviketekniikka

Bioteekniikka

2015

Tero Kallio

# KROMATOGRAFIAAN PERUSTUVAN MENETELMÄN KEHITTÄMINEN INFLUENSSA B -VIRUKSEN NUKLEOPROTEIININ PUHDISTAMISEKSI



TURUN AMMATTIKORKEAKOULU  
TURKU UNIVERSITY OF APPLIED SCIENCES

OPINNÄYTETYÖ (AMK) | TIIVISTELMÄ

TURUN AMMATTIKORKEAKOULU

Bio- ja elintarviketekniikka | Biotekniikka

2015 | 55 sivua

Ohjaajat: FM Kaj Sjöblom, Dos. Petri Susi

Tero Kallio

# KROMATOGRAFIAAN PERUSTUVAN MENETELMÄN KEHITTÄMINEN INFLUENSSA B - VIRUKSEN NUKLEOPROTEIININ PUHDISTAMISEKSI

Opinnäytetyön tarkoituksena oli kehittää kromatografinen puhdistusmenetelmä *Pichia pastoris* -hiivasoluissa tuotetun Influenssa B -viruksen nukleoproteiinin (InB-NP) puhdistamiseksi. Työssä keskityttiin ioninvaihtokromatografiseen menetelmään ja siinä pyrittiin löytämään sopiva ioninvaihtomatriisi ja oikeanlaiset ajo-olosuhteet kohdeproteiinin puhdistamiseksi.

Työssä tehtiin kaikkiaan 25 erilaista ioninvaihtoaajoa. Anioninvaihtomatriisit soveltuivat selkeästi paremmin InB-NP:n puhdistamiseen kuin kationinvaihtomatriisit. Puhdistusprosessissa käytettiin myös geelisuodatusta jälkipuhdistusmenetelmänä ioninvaihdon jälkeen. Geelisuodatuksen ei kuitenkaan paneuduttu yhtä syvällisesti kuin ioninvaihtokromatografiaan.

Ennen kromatografisia työvaiheita, työssä käytettiin sentrifugointia ja ultrasuodatusta. Sentrifugointia käytettiin prosessin alkupäässä kiintoaineen erottamiseen soluhajotuksen jälkeisestä lysaatista, kun taas ultrasuodatusta käytettiin näytteiden konsentrointiin ja puskurinvaihtoon.

Opinnäytetyössä saatiin tietoa erilaisten matriisien ja ajo-olosuhteiden soveltuvuudesta InB-NP-proteiinin ioninvaihtokromatografiseen puhdistamiseen. Testattujen ioninvaihtoaajojen tulosten perusteella tehtiin vielä yksi suuremman mittakaavan anioninvaihtoaajo, jota seurasi yllämainitut ultrasuodatus- ja geelisuodatusprosessit. Prosessista tehtiin puhdistuskaavio, jonka pohjalta saatiin laskettua saanto ja spesifinen aktiivisuus prosessin eri vaiheista.

## ASIASANAT:

kromatografia, Influenssa B -virus, proteiinipuhdistus, ioninvaihto

BACHELOR'S THESIS | ABSTRACT

TURKU UNIVERSITY OF APPLIED SCIENCES

Biotechnology and Food Technology | Biotechnology

2015 | 55 pages

Instructors: M.Sc. Kaj Sjöblom, Docent Petri Susi

Tero Kallio

## DEVELOPMENT OF CHROMATOGRAPHIC METHOD FOR PURIFICATION OF INFLUENZA B VIRUS NUCLEOPROTEIN

The objective of this thesis was to develop a chromatographic purification method for Influenza B virus nucleoprotein (InB NP) produced in *Pichia pastoris* yeast cells. The thesis focused on Ion Exchange Chromatography (IEX) and the aim was to find a suitable Ion Exchange matrix and appropriate running conditions for the purification of the target protein.

The study involved 25 different Ion Exchange runs in total. The anion exchange matrices worked in InB NP purification significantly better than the cation exchange matrices. In the purification process, gel filtration was used as a second downstream process method after the Ion Exchange process. However, the main focus was not on gel filtration.

Chromatographic purification steps were preceded by centrifugation and ultrafiltration. Centrifugation was used at the beginning of the process to separate the solid matter from the cell disruption lysate, whereas ultrafiltration was used for sample concentration and buffer exchange.

In the thesis, information was obtained on different matrices and running circumstances suitable for the Ion Exchange Chromatographic purification of InB NP. Based on the results of the IEX test runs, one run was performed at a greater scale, followed by the ultrafiltration and gel filtration process. A purification scheme of the process was prepared and used to calculate the yield and the specific activity of each process step.

### KEYWORDS:

chromatography, Influenza B, protein purification, Ion Exchange

# SISÄLTÖ

<b>KÄYTETYT LYHENTEET (TAI SANASTO)</b>	<b>7</b>
<b>1 JOHDANTO</b>	<b>8</b>
<b>2 TEORIA</b>	<b>11</b>
2.1 Influenssa B -viruksen nukleoproteiini	11
2.2 Ioninvaihtokromatografia	11
2.2.1 Toimintaperiaate	11
2.2.2 Ioninvaihtomatriisien rakenne	13
2.2.3 Proteiinin ioninen luonne	14
2.3 Geelisuodatus	15
2.3.1 Toimintaperiaate	16
2.3.2 Geelisuodatuksen matriisit	16
<b>3 MATERIAALIT, MENETELMÄT JA LAITTEET</b>	<b>17</b>
3.1 Puskureiden valmistus	17
3.2 Soluhajotus	17
3.3 Näytteiden valmistelu ioninvaihtoihin	18
3.4 Ioninvaihtokromatografia	18
3.4.1 Matriisien vertailu	18
3.4.2 Anioninvaihto suuremmalla mittakaavalla	19
3.5 Konsentroidi ja puskurin vaihto	21
3.6 Geelisuodatus	21
3.7 Konsentroidi ultrasuodatuksella (Amicon Ultra)	22
3.8 Influenssa B -viruksen nukleoproteiinin tunnistaminen TR-FIA-menetelmällä (eng. time-resolved fluoroimmunoassay) <sup>5</sup>	22
3.8.1 Kuoppalevyjen päällystäminen (coating)	23
3.9 BCA-mittaus kokonaisproteiinikonsentraation määrittämiseksi	24
3.10 SDS-PAGE	24
3.11 Western blot -menetelmä	25
<b>4 TULOSTEN TARKASTELU</b>	<b>26</b>
4.1 Ioninvaihtokromatografia	26
4.1.1 Matriisin valinta	26

4.1.2 Suuren mittakaavan anioninvaihdon kromatogrammi, fraktioiden aktiivisuudet ja sitomiskapasiteetti	29
4.2 Konsentroidi ja puskurinvaihto	32
4.3 Geelisuodatus	35
4.4 Konsentroidi ultrasuodatuksella (Amicon Ultra)	37
4.5 SDS-PAGE- ja Western blot -tulokset	38
4.6 Puhdistuskaavio puhdistusprosessista	41
4.7 InB-NP:n säilyvyystutkimus lysaatista	43
<b>5 JOHTOPÄÄTÖKSET</b>	<b>45</b>
<b>LÄHTEET</b>	<b>48</b>

## LIITTEET

Liite 1. InB-NP:n aminohapposekvenssi massaspektrometriaajon jälkeen
Liite 2. BCA-mittaustulokset
Liite 3. 20 ml pylvään anioninvaihtoajon TR-FIA-mittaustulokset
Liite 4. Konsentroidin TR-FIA-mittaustulokset
Liite 5. Geelisuodatuksen TR-FIA-mittaustulokset
Liite 6. Viimeisen konsentroidin TR-FIA-mittaustulokset
Liite 7. TR-FIA-mittaustulokset lysaatin säilyvyystutkimukselle

## KUVAT

Kuva 1. Kromatogrammi IEX-ajosta pH 6:ssa 1 ml Q XL -pylväessä.	28
Kuva 2. Kromatogrammi anioninvaihtoajosta, johon on yhdistetty TR-FIA-mittauksen histogrammi.	30
Kuva 3. InB-NP:n TR-FIA-mittausignaali konsentroidin eri vaiheista. Kuvan pylväissä on huomioitu näytteiden laimennokset ja tilavuudet.	34
Kuva 4. Geelisuodatuksen kromatogrammi ja TR-FIA-mittauksen histogrammi.	36
Kuva 5. Geelisuodatuksen fraktioiden kokonaisaktiivisuudet ennen konsentroidia ja sen jälkeen mitattuna TR-FIA:lla.	37
Kuva 6. SDS-PAGE- ja Western blot -kuvat suuren mittakoon IEX-ajon näytteistä.	39
Kuva 7. Geelisuodatuksen konsentroitujen fraktioiden SDS-PAGE-geeli ja Western blot -kalvo.	40
Kuva 8. Säilyvyystutkimuksen tulokset.	44

## KUVIOT

Kuvio 1. InB -viruksen nukleoproteiinin puhdistusprosessin kulku lohkokaaavana.	10
Kuvio 2. pH-titrauskäyrä glysiinille (Bonner P. 2007. Protein purification. Taylor & Francis Group. sivu 80).	15

## TAULUKOT

Taulukko 1. Anioninvaihtojen sitomiskapasiteetit 1 ml testipylväillä.	27
Taulukko 2. Anioninvaihdon sitomiskapasiteetti TR-FIA-mittauksen pohjalta.	31
Taulukko 3. Konsentroinnin spesifinen aktiivisuus, puhdistuskerroin ja saanto.	33
Taulukko 4. Puhdistuskaavio puhdistusprosessista.	42

## KÄYTETYT LYHENTEET (TAI SANASTO)

IEX	Ioninvaihtokromatografia
pI	Isoelektrinen piste
In	Influenssavirus
InB	Influenssa B
NP	Nukleoproteiini
CV	Kolonnin tilavuus (Column Volume)
FT	Kiinnittymätön aines (proteiinit) ioninvaihdossa ennen eluutiota (eng. Flow through)
PBS	Fosfaattipuskuroitu saliini
PBST	Fosfaattipuskuri + Tween-20 (detergentti)
MB	Multibuffer
AB	Assaybuffer
GF	Geelisuodatus
BSA	Bovine serum albumin

# 1 JOHDANTO

Influenssavirus (In) on merkittävä patogeeni ja sen tunnistaminen taudin alkuvaiheessa on hoidon kannalta oleellista. Influenssavirukset jaotellaan A-, B- ja C-tyyppeihin. Diagnostiikan kannalta merkittävimmät tyypit ovat A- ja B-tyypit. A-tyypit jaotellaan alatyyppeihin niiden eri pintaproteiinien perusteella. B-tyypin eri viruskannoilla on myös eroavaisuuksia, mutta niitä ei erotella eri alatyyppeihin. B-tyypit jaotellaankin lähinnä linjan alkuperän mukaan.<sup>1,2</sup> Influenssavirusten nimeäminen tapahtuu WHO:n määrittelemällä tavalla.<sup>1</sup>

Influenssavirukset ovat vaipallisia viruksia, eli viruspartikkeli koostuu plasmamembraanista, jossa sijaitsevat infektion kannalta oleelliset hemagglutiniini- ja neuraminidaasi-proteiinit, sekä vaipan sisällä olevasta ribonukleoproteiinipartikelista.<sup>3,4</sup> Influenssaviruksen vaippa koostuu lipidikaksoiskerroksesta, jonka se on saanut isäntäsolusta.<sup>4</sup> Diagnostiikan kannalta on merkittävää, että nukleoproteiini (NP) on hyvin konservoitunut, minkä takia on onnistuttu kehittämään laaja-alaisesti toimivia In-vasta-aineita, joiden avulla virusten tunnistaminen on mahdollista nopeasti ja suurella herkkyydellä.<sup>5</sup> Vasta-aineita käytetään mm. pikatesteissä (Actim Medix Biochemica) ja TR-FIA-testissä, jota käytettiin myös tässä työssä.<sup>5</sup> Diagnostisissa testeissä käytettävä InB-NP eristetään yleensä viruspartikkeleista ja sen käytön yksi ongelma on infektiovaara ja epästabiilius.

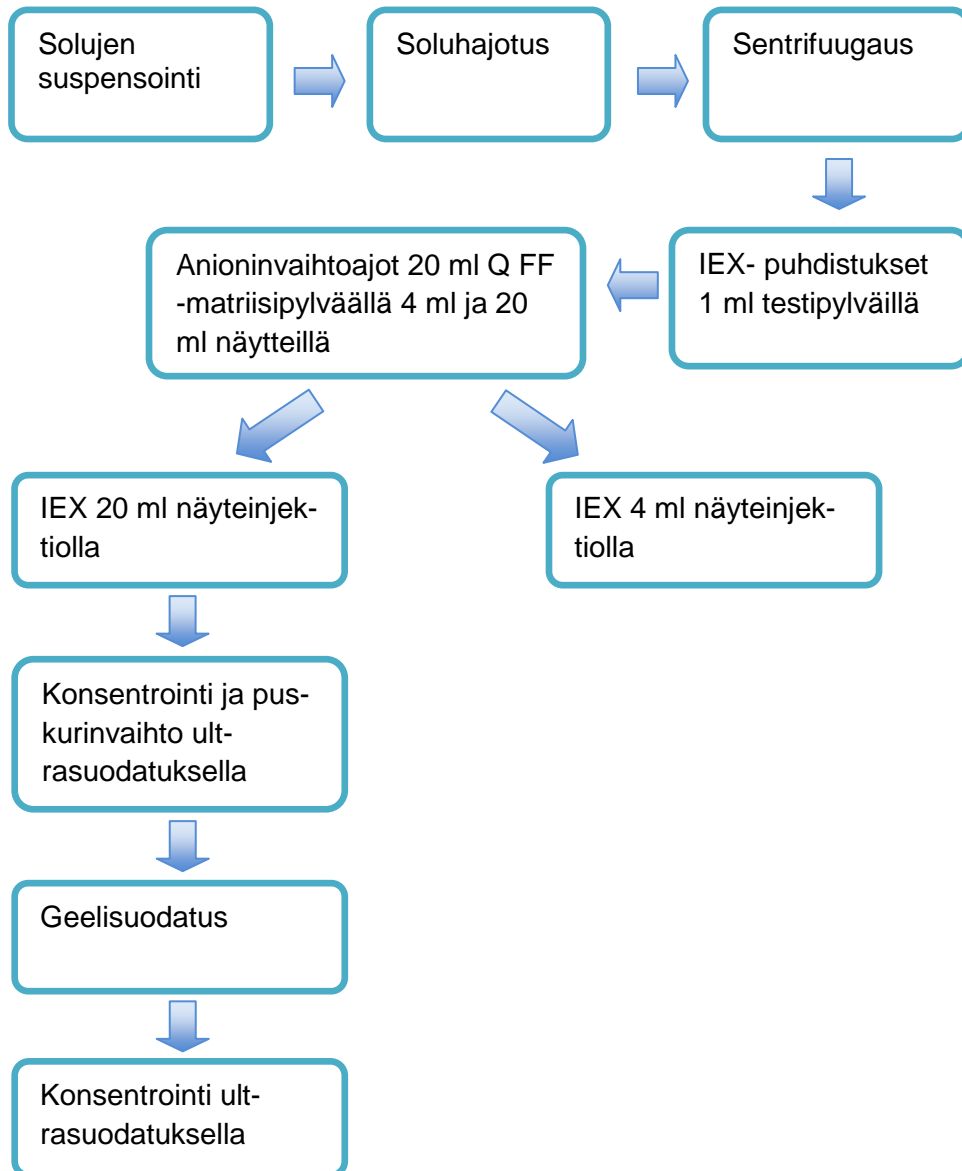
Tämän työn tavoitteena oli testata erilaisia kromatografisia puhdistusmenetelmiä *Pichia pastoris* -hiivasoluissa tuotetun Influenssa B -viruksen nukleoproteiinin (InB-NP) puhdistamiseksi ja stabiiliuden tutkimiseksi.

Työssä käytettiin pääasiasiallisesti ioninvaihtokromatografiaa ja siinä tehtiin kaikkiaan 25 ioninvaihtoajoja. Ajoista kuusi ensimmäistä olivat kationinvaihtoja ja loput anioninvaihtoja, koska anioninvaihto toimi parhaiten puhdistuksessa. Työssä tehtiin aluksi koeajoja eri matriiseja sisältävillä pienillä yhden millilitran testipylväillä eri pH-olosuhteissa. Näillä testiajoilla pyrittiin löytämään mahdollisimman optimaalinen ioninvaihtomatriisi ja optimaalinen pH-olosuhde kohdeproteiinin ioninvaihtokromatografiseen puhdistukseen. Tämän jälkeen hyväksi



osoittautunutta matriisi-pH-yhdistelmää käytettiin suuremmassa mittakaavassa 20 ml:n matriisipylväällä ja 20 ml:n näytteesyötöllä. Suuremman mittakaavan ioninvaihtoaaja seurasi vielä muita jälkipuhdistus- ja konsentroitivaiheita, joista kromatografisena puhdistusmenetelmänä käytettiin mm. geelisuodatusta (GF, eng. gel filtration). Puhdistusprosessin kulku kuvataan lohkokaaavana kuviossa 1.

Työssä tutkittiin lisäksi myös InB-NP-proteiinin säilyvyyttä soluhajotuksen jälkeen vesisuspensioon tehdystä näytteestä sekä pakastin- että jääkaappiolosuhteissa. Säilyvyyttä tutkittiin mittaamalla näytteistä Influenssa B -viruksen nukleoproteiinin määrä vasta-aineilla päällystetyillä kuoppalevyillä ja TR-FIA-mittauksella.



Kuvio 1. InB -viruksen nukleoproteiinin puhdistusprosessin kulku lohkokaaavana.

## 2 TEORIA

### 2.1 Influenssa B -viruksen nukleoproteiini

Työssä käytettiin Hydrobody-projektissa kehitettyä InB-NP-proteiinia tuottavaa *Pichia pastoris* -hiivakantaa, josta puhdistettava proteiini eristettiin. InB-NP-proteiinia koodaava konservoitunut sekvenssi oli haettu geenipankista<sup>6</sup>. Tuotetun proteiinin luonne (rakenne) oli työtä aloitettaessa epäselvä, mutta erilaiset biofysikaaliset kokeet olivat antaneet viitteitä siitä, että proteiinituote olisi aggregaatti tai ns. viruksen kaltainen tuote (VLP, eng. virus-like particle). Tämän johdosta yksittäiselle proteiinille voitiin laskea teoreettinen pI-arvo, jonka perusteella lähdettiin suunnittelemaan kromatografia-ajo-olosuhteita.

Puhdistettavan InB-NP-proteiinin massaspektrometrialla saatu aminohapposekvenssi on liitteessä 1. Sekvenssin avulla saatiin määritettyä proteiinin mahdollinen pI-arvo ja molekyyli massa Internet-laskuria käyttäen. (<http://isoelectric.ovh.org/>).<sup>7</sup> Laskennallinen pI on kuitenkin hyvin suuntaa-antava, koska proteiinin makroympäristöllä on erittäin suuri vaikutus proteiinin pI:hin. Laskennalliseksi pI:ksi saatiin noin pH 8 ja molekyyli massaksi noin 82 500 Da.<sup>7</sup>

### 2.2 Ioninvaihtokromatografia

#### 2.2.1 Toimintaperiaate

Ioninvaihtokromatografinen erotusprosessi perustuu näytteen komponenttien ja kiinteän matriisin välille muodostuvaan ioniseen kiinnittymiseen.<sup>8</sup> Ioninvaihtokromatografia on monipuolinen erotusmenetelmä, jota voidaan käyttää varauksellisen funktionaalisen ryhmän omaavien biologisten komponenttien puhdistamiseen. Proteiinit on johdettu eri geeneistä, jolloin niiden aminohappomäärät ja aminohapposisällöt eroavat toisistaan.<sup>9</sup> Proteiinit muodostuvat aminohapoista, jotka sisältävät monia kemiallisia ryhmiä kiinnittyneinä peptidirunkoon. Nämä

kemialliset ryhmät voivat olla joko positiivisesti tai negatiivisesti varautuneita, tai sähköisesti neutraaleja. Ioninvaihtoresiini, eli kiinteä matriisi, sisältää sähköisesti varautuneita ryhmiä esimerkiksi karboksyyli-ryhmiä tai kvaternaarisia aminoryhmiä, jotka ovat kovalenttisesti kiinnittyneinä resiinirungossa. Tästä seuraa, että matriisiin jokaisella kiinnitetyllä varauksella on olemassa vastakkaisen varauksen omaava vastaioni, joka voi kiinnittyä vain ionisella voimalla.<sup>8</sup>

Proteiinin varaukselliset osat, joilla on vastakkainen varaus resiiniin nähden, kiinnittyvät kiinteään resiiniin. Proteiinin varauksellinen osa korvaa matriisin vastaionin, jolloin proteiini kiinnittyy matriisiin ionisen vuorovaikutuksen ansiosta. Varauksettomat proteiinit eivät kiinnity resiiniin ja ne voidaan näin erottaa pesemällä. Ionisella vuorovaikutuksella kiinnittynyt proteiini voidaan poistaa tai eluoida resiinistä ionilla, jolla on suurempi affiniteetti kiinteään faasiin kuin itse proteiinilla.<sup>8</sup>

Ioninvaihtoon tarvitaan neljä eri vaihetta. Ensimmäinen vaihe on matriisin tasapainotus, jossa matalan ionisen voiman omaavaa puskuria ajetaan pylvään läpi ja matriisin positiivisesti tai negatiivisesti varautuneet ryhmät saavat vastaionit. Toisena vaiheena pylvääseen syötetään näyte, jossa olevat proteiinit kiinnittyvät matriisiin ionisella voimalla. Kolmantena vaiheena suoritetaan eluutio, jossa pylvääseen ajetaan puskuria, jolla on korkeampi ioninen voima, minkä seurauksena proteiinit irtoavat pylväästä. Neljäntenä vaiheena on matriisin pesu, jossa matriisista irrotetaan korkealla ionivahvuudella kaikkein kovimmin ionisesti kiinnittyneet proteiinit ennen seuraavaa tasapainotusta ja ajoa.<sup>10</sup>

Eluutiossa käytetään ionivahvuuden kasvattamiseksi useimmiten suolagradienttia kuten esimerkiksi tässä työssä käytetty NaCl-gradientti. Eluutiotapoja on kolme erilaista: isokraattinen, portaittain nouseva, tai lineaarisesti nouseva gradientti. Isokraattisessa gradientissa ionikonsentraatio on koko eluution ajan sama. Portaittaisessa gradientissa ionivahvuutta nostetaan portaittain, jolloin eri ionivahvuuksien proteiinit irtoavat eri portaissa. Lineaarisesti nousevassa gradientissa konsentraatiota nostetaan tasaisesti määrättyyn pisteeseen asti.<sup>10</sup>

Eluutio voidaan myös toteuttaa pH-gradientilla suolagradientin sijaan. Tällöin kiinnittyneiden proteiinien pintavaraus muuttuu pH-olosuhteiden muutoksesta, minkä seurauksena proteiini irtoaa matriisista. pH:ta muutettaessa proteiinit voivat kuitenkin denaturoitua lähestyttäessä isoelektristä pistettä. Ioninvaihtokromatografiassa onkin suositellumpaa käyttää eluutiossa nousevaa suolakonsentraatiota.<sup>9</sup>

IEX-kolonnin resoluutio on tärkeä tekijä kehiteltäessä hyvää ioninvaihtokromatografiaa. Resoluutio koostuu seuraavista asioista: piikkien välinen etäisyys toisistaan eluutiossa, pylvään kyvystä muodostaa teräviä symmetrisiä piikkejä ja näytteen määrästä (massasta). Edellä mainittuihin tekijöihin vaikuttavat erilaiset käytännön asiat kuten esimerkiksi matriisin ominaisuudet, sitomis- ja eluutio-olosuhteet, kolonnin pakkaaminen ja virtausnopeudet. Resoluutio saadaan määriteltä kromatogrammista, kun kahden piikin korkeimpien kohtien välinen etäisyys jaetaan piikkien leveyden keskiarvolla, eli piikkien huippujen välinen etäisyys / piikkien leveyksien keskiarvo.<sup>10</sup>

Resoluutioon vaikuttavat siis kolonnin tehokkuus ja selektiivisyys. Kolonnin tehokkuudella tarkoitetaan kolonnin kykyä muodostaa eluutiossa teräviä symmetrisiä piikkejä. Kolonnin selektiivisyydellä tarkoitetaan taas sitä, missä olosuhteissa yksilöllisten proteiinien piikit ovat mahdollisimman kaukana ja erillään toisistaan. Selektiivisyyteen ei vaikuta pelkästään matriisin funktionaalisten ryhmien tyyppi ja määrä, vaan siihen vaikuttavat myös testausolosuhteet: pH, ioninen voima ja eluutio-olosuhteet. Resoluutiota määritettäessä hyvä selektiivisyys on tärkeämpi tekijä kuin korkea tehokkuus.<sup>10</sup>

### 2.2.2 Ioninvaihtomatriisien rakenne

Ioninvaihtomatriisit on valmistettu joko huokoisesta tai ei-huokoisesta aineesta sen käyttötarkoituksen mukaan. Matriisi tulee valita tarpeen mukaan joko fyysisen stabiiliuden, hyvän kemiallisen kestävyys, tai matalan ei-spesifisen vuorovaikutuksen takia. Matriisiin on myös liitetty funktionaalinen ryhmä, joka määrittää sen varauksen.<sup>9,10</sup> Funktionaalinen ryhmä voi olla joko vahva tai heik-

ko, mikä määrittää sen kuinka paljon ionisaation vahvuus muuttuu matriisissa pH-arvoa muutettaessa. Vahvassa ioninvaihtomatriisissa ioninvaihtokapasiteetti ei muutu pH-arvoa muutettaessa. Heikolla ioninvaihtajalla sen sijaan ioninvaihtokapasiteettia voidaan muuttaa pH-arvoa muuttamalla, jolloin myös matriisin selektiivisyyteen pystytään vaikuttamaan.<sup>10</sup>

Modernit IEX-matriisit ovat joko polymeeri- tai agaroosipohjaisia. Niiden korkean sitomiskapasiteetin, fysikaalisen ja kemiallisen stabiiliuden lisäksi niiden hiukaskokoja voidaan muuttaa, jolloin niillä on monia eri sovelluksia.<sup>10</sup>

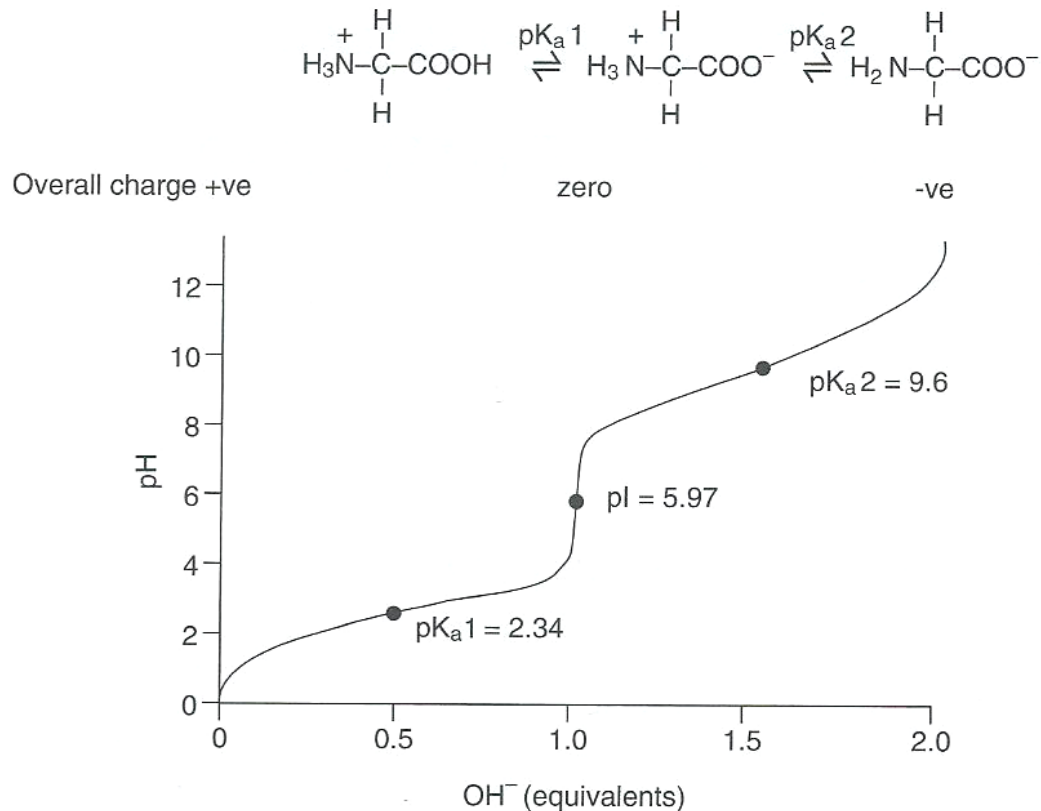
Tässä työssä käytettiin Sefaroosi-matriiseja, joiden runko koostuu agaroosista. Agaroosirunko on muodostettu ketjuttamalla agaroosia toistensa kanssa ristiin. Nämä ketjut muodostavat kestävä, makrohuokoisen matriisin, jolla on hyvä sitomiskapasiteetti ja vähäinen ei-spesifinen adsorptio.<sup>10</sup>

### 2.2.3 Proteiinin ioninen luonne

Proteiineilla on sekä positiivisesti, että negatiivisesti varautuneita ryhmiä ja niitä kutsutaan näin amfoteerisiksi. Nämä ryhmät muodostavat proteiinille erilaisen pintavarauksen olosuhteista riippuen. Eri sivuryhmien varaus on pH-riippuvainen. pH:ta, jossa proteiinin pinnan nettovaraus on nolla, kutsutaan isoelektriseksi pisteeksi (pI).<sup>8</sup>

Optimaalisia ioninvaihtoerotuksen olosuhteita etsittäessä olisi hyvä tietää sekä proteiinin pintavarauksen vaihtelu pH-arvon mukaan että proteiinin isoelektrinen piste. Työskennellessä ioninvaihtokromatografian kanssa olisi myös hyvä tietää pH-alue, jossa proteiini pysyy vakaana. pH:n ollessa isoelektrisen pisteen alapuolella, proteiinin nettovaraus on positiivinen ja proteiini kiinnittyy kationinvaihtimeen. pH:n taas ollessa pI:n yläpuolella, nettovaraus on negatiivinen ja proteiini kiinnittyy anioninvaihtimeen (Kuvio 2.).<sup>8,9,10</sup> Kun pH on  $\pm 1,0$  isoelektriseen pisteeseen nähden, proteiinilla on riittävä ioninen varaus kiinnittyäkseen vastakaisen varauksen omaavaan partikkeliin. Noin 70 % proteiineista pI on pH-välillä 4 ja 7, mikä tarkoittaa, että fysiologisessa pH:ssa proteiineilla on useimmiten negatiivinen pintavaraus.<sup>9</sup>

Sopiva ioninvaihtomatriisi tulee siis valita proteiinin pintavarauksen ja näytteen muiden fysikaalisten ominaisuuksien mukaan. Alla on kuvattu vielä pH:n vaikutus proteiinin pintavaraukseen:



Kuvio 2. pH-titrauskäyrä glysiinille (Bonner P. 2007. Protein purification. Taylor & Francis Group. sivu 80).

### 2.3 Geelisuodatus

Geelisuodatus (GF, eng. gel filtration tai SEC, size exclusion chromatography) on kromatografinen puhdistusmenetelmä, joka perustuu proteiinimolekyylien erotteluun niiden koon perusteella. Geelisuodatuksessa proteiinit voidaan erottaa toisistaan niiden natiivissa konformaatioissa. Geelisuodatuksessa proteiinin ja kiinteään matriisiin välille ei muodostu absorptiota, minkä ansiosta proteiinin biologinen aktiivisuus säilyy hyvin. Toisaalta geelisuodatuksella on myös heikkouksia: sillä on pieni kapasiteetti, näyte laimenee ja sen resoluutio on keskin-

kertainen. Tämän takia geelisuodatusta käytetään usein puhdistusprosessin lopussa, jolloin näytteessä on yleensä vähemmän proteiineja.<sup>9</sup>

### 2.3.1 Toimintaperiaate

Geelisuodatuksessa suuremmat molekyylit kulkevat kolonnin läpi nopeammin kuin pienet molekyylit. Geelisuodatuksen erottelu perustuu erikokoisten molekyylien kykyyn mennä kiinteään stationääriseen faasin huokosten sisään. Molekyylin käyttämä aika kolonnin läpi kulkemiseen riippuu molekyylin koosta ja muodosta. Mitä pienempi molekyyli on, sitä syvemmälle matriisin huokosiin se pääsee, jolloin se viipyy kolonnissa pidempään.<sup>8</sup> Jotkut proteiinit eivät kuitenkaan käyttäydy oletetulla tavalla. Esim. pitkät ja ohuet proteiinit eluoituvat nopeammin kuin saman massan omaavat pallonmuotoiset proteiinit.<sup>9</sup>

Geelisuodatuksen kromatogrammissa erikokoiset proteiinit muodostavat kukin oman piikkinsä.<sup>9</sup>

### 2.3.2 Geelisuodatuksen matriisit

Geelisuodatuksen matriisit on tehty pohjimmiltaan inertistä, biologiseen tarkoitukseen sopivasta materiaalista. Markkinoilta löytyy proteiininäytteille monia erilaisia matriiseja erilaisilla fraktiointialueilla.<sup>9</sup> Matriisit voidaan erotella toisistaan mm. huokoskoon, rakenteellisten eroavaisuuksien ja distribuution perusteella. Edellä mainituista ominaisuuksista matriisin huokoskoolla on suurin vaikutus geelisuodatuksen resoluutioon.<sup>8</sup>

Matriisin materiaalin ominaisuudet määrittelevät huokosten tyypin ja mekaanisen voiman. Esimerkkejä kaupallisten geelisuodatusmatriisien materiaaleista ovat mm. akryyliamidi, agaroosi, dextraani, polyvinyyli ja silika.<sup>8</sup>



### 3 MATERIAALIT, MENETELMÄT JA LAITTEET

#### 3.1 Puskureiden valmistus

Anioninvaihtoja varten valmistettiin 50 mM fosfaattipuskureita eri pH-arvoissa (pH:t 6,7 ja 8) käyttäen 0,1 M  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ - ja  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ -kantaliuoksia. Kantaliuoksien suhteita muuttamalla puskureille saatiin haluttu pH-arvo.

Anioninvaihtoihin valmistettiin 20mM Tris-puskuria pH-arvoille 7 ja 8 (Fisher Chemical Tris Base). pH:n säätö tehtiin 1 M HCl-liuoksella (Fisher Chemical). Anioninvaihtoon valmistettiin myös 20 mM Pipes-puskuria (pH 6) (Fisher Chemical). pH:n säätöön käytettiin 1 M NaOH-liuosta (Fisher Chemical).

Ioninvaihtojen eluutioita varten kaikista yllä mainituista puskureista valmistettiin myös 1 molaarisen NaCl-konsentraation omaavat puskurit: 1 M NaCl + 20 mM Tris, 1 M NaCl + 50 mM  $\text{PO}_4$  ja 1 M NaCl + 20 mM Pipes. Suolana käytettiin NaCl:a (Fisher Scientific).

#### 3.2 Soluhajotus

*Pichia pastoris* -solut suspensoitiin ultrapuhtaaseen veteen. Noin 50 g solumassaa suspensoitiin noin 50 ml:aan ultrapuhdasta vettä. Suspensiota saatiin noin 100 ml. Solut hajotettiin käyttämällä French Press -soluprässiä (Thermo electron Corporation). AMK:n soluprässin suurin tilavuus oli 35 ml, minkä takia suspensio hajotettiin kolmessa erässä. Kussakin erässä käytettiin 20 000 psi:n painetta ja hajotus toistettiin kolme kertaa per erä.

Hajotetut solut sentrifugoitiin kolmessa falcon-putkessa Heraeus Contifuge Stratos -sentrifugilla (16 000 x g, 20 min, 4 °C). Sentrifugoinnin jälkeen supernatantit yhdistettiin. Lysaattia saatiin kaikkiaan noin 66 ml.

50 µl lysaattia pipetoitiin 18 mikroputkeen ja näytteet pakastettiin proteiinin säilyvyydestä varten. Loput näytteestä laitettiin kahteen falcon-putkeen jääkaappisäilytykseen jatkopuhdistusta varten.

### 3.3 Näytteiden valmistelu ioninvaihtoihin

Injektoitavat näytteet valmistettiin soluhajotuksen jälkeisestä lysaatista. Näytettä valmistettiin 1 ml jokaista 1ml:n pylvään ajoa kohden. Lysaattia laimennettiin puskuriin siten, että näytteen pH olisi sama kuin ioninvaihdossa käytettävissä puskureissa.

Kationinvaihdoissa näyte laimennettiin 100 mM fosfaattipuskuriin siten, että loppukonsentraatio oli 50 mM, eli putkeen pipetoitiin 500 µl lysaattia ja 500 µl 100 mM puskuria.

Anioninvaihdoissa näytteet laimennettiin 50 mM Tris-puskuriin siten, että loppukonsentraatio oli 20 mM, eli putkeen pipetoitiin 600 µl näytettä ja 400 µl 50 mM puskuria.

Näytteet sentrifugoitiin vielä kerran (18 000 x g, 20 min, 4 °C) ja supernatantit kerättiin talteen pipetoimalla.

### 3.4 Ioninvaihtokromatografia

#### 3.4.1 Matriisien vertailu

Eri ioninvaihtomatriiseja ja pH-olosuhteita kokeiltiin ennen suuren mittakaavan ajoa. Koeajot suoritettiin valmiiksi pakatuilla kolonneilla 1 ml:n tilavuudessa. Pylväät olivat HiTrap IEX Selection Kitistä (GE Healthcare) ja kromatografialaitteistona oli Äkta Explorer (GE Healthcare). Käytetyt matriisit kationinvaihdossa olivat SP XL (Sephacrose XL) ja CM FF (Carboxymethyl Fast Flow). Molemmilla matriiseilla suoritettiin kolme eri kationinvaihtoajoa, joissa puskurin pH oli 7, 8 tai 9.

Anioninvaihdossa käytetyt matriisit olivat HiTrap Q Sepharose FF, Q XL, DEAE FF ja ANX FF. Kaikilla neljällä matriisilla suoritettiin neljä eri ajoa pH:ssa 6,7,8 ja 9. Kaikki työssä käytetyt matriisit ja kolonnit olivat GE Healthcaren valmistamia.

Ioninvaihdossa näyte syötettiin kolonniin 0,5 ml luupin avulla. Ajoissa käytetyt parametrit olivat seuraavanlaiset:

- virtausnopeus: 1ml/min
- regenerointi: 5 CV
- aallonpituus: 280 nm
- FT-fraktioiden koko: 1,5 ml
- luupin tyhjennys: 1 ml
- pesuvaihe: 5 CV
- eluutiofraktioiden koko: 0,5 ml
- eluutio: lineaarinen nouseva 1 M NaCl-gradientti 5 CV:n kestolla.

Eri ajojen kromatogrammit asetettiin ajojen jälkeen päällekkäin, jolloin matriisien toimivuutta kohdeproteiinin puhdistamiseen oli selkeämpi vertailla. Kromatografisten ajojen jälkeen suoritettiin eluutio- ja FT-fraktioista Influenssa B -viruksen nukleoproteiinin vasta-ainemääritykset, jolloin löydettiin parhaiten toimiva matriisi-pH-yhdistelmä.

### 3.4.2 Anioninvaihto suuremmalla mittakaavalla

Suuremman mittakoon ioninvaihtoajoja tehtiin kolme kertaa. Kahdessa ensimmäisessä ajossa puhdistettavaa lyaattia injektointiin 4 ml:n luupilla ja viimeisessä ajossa käytettiin 20 ml:n superluuppia. Kromatografialaitteena käytettiin Äkta Exploreria (GE Healthcare).

Suuremman mittakoon ajossa käytettiin XK16/20 lasikolonnia, jonka mitat olivat  $d = 16 \text{ mm}$  ja  $h = 200 \text{ mm}$ . Matriisina käytettiin Q Sepharose Fast Flow -matriisia. Matriisia pakattiin pylvääseen noin 20 ml. Pakkaamiseen käytettiin apuna 1 x PBS + 20 % EtOH puskuria.

Kolonnin valmistaja antoi kolonnille virtausnopeussuositukseksi 400 - 700 cm/h. Ajossa käytettiin virtausnopeutena 10 ml/min, vaikka 13,3 – 23,5 ml/min olisikin ollut tällä pylväällä laskennallinen alue.

Ajoon käytettiin A-puskurina 20 mM Tris pH 7 -puskuria. Eluutiossa taas B-puskurina 20 mM Tris pH 7 + 1 M NaCl.

Näytteet valmisteltiin pipetoimalla 1,5 ml:n mikroputkiin 900 µl lysaattia ja 600 µl 50 mM Tris-puskuria (pH 7), jonka jälkeen putkia sentrifugoitiin (18 000 x g, 20 min, 4 °C). Kahdessa ensimmäisessä ajossa supernatanttia siirrettiin noin 5 ml ruiskuun, jonka sisältö injektointiin 4 ml:n luuppiin. Kolmannessa ja viimeisessä 20 ml näyteinjektointin ajossa ei voitu käyttää pieniä letkuluuppeja, vaan 20 ml:n putkiluuppia (Superloop). Viimeisen ajon näytteet valmisteltiin muuten samoin kuin pienemmän injektointin ajoihin, mutta supernatantit kerättiin useammasta mikroputkesta suurempaan ruiskuun ja näyte puristettiin vielä ruiskusuodattimen läpi puhdistettuun 20 ml:n superluuppiin. Superluuppi kiinnitettiin kromatografialaitteen injektointiyksikköön ennen ajon aloitusta.

Kahdessa ensimmäisessä 4 ml injektointin ajoissa käytettiin ajoparametreina:

- virtausnopeus: 10 ml/min
- aallonpituus: 280 nm
- tasapainotus: 5 CV A-puskurilla
- FT-fraktioiden koko: 10 ml
- näyteluupin tyhjennys: 6 ml
- pesuvaihe: 3 CV
- eluutiofraktioiden koko: 5 ml
- eluutio: lineaarinen nouseva gradientti 100 % B-puskurin konsentraatioon 5 CV:n gradientin kestolla
- gradientin viive: 20 ml
- viimeinen pesu: B-puskuri 5 CV

Viimeisessä 20 millilitran näyteinjektointin ajossa käytettiin muuten samoja parametreja kuin edellä mainituissa 4 ml näytteen ajoissa, mutta näyteluupin tyhjennys tapahtui 20 millilitralla.

Ajoista saatujen kromatogrammien perusteella fraktioille, joilla oli korkeimmat piikit, tehtiin jatkomäärityksiä kohdeproteiinin irtoamishetken selvittämiseksi. 4 ml näytteillä ajetuissa ioninvaihdossa InB-NP-proteiinin saanto oli niin pieni, ettei puhdistusta jatkettu pidemmälle. Sen sijaan 20 ml näytteen ajossa saanto oli suurempi ja puhdistusta jatkettiin pidemmälle. 20 ml näytteen ajon fraktioista tehtiin InB-NP-proteiinin vasta-ainemääritys (TR-FIA-mittaus) ja parhaat fraktiot yhdistettiin jatkoa varten.

### 3.5 Konsentroidi ja puskurin vaihto

Anioninvaihdon jälkeen Influenssa B -viruksen nukleoproteiinia sisältävät fraktiot kerättiin yhteen. Lopputilavuudeksi saatiin noin 19,5 ml, jonka jälkeen lyaatti konsentroidiin Amicon Ultrafiltration cell -suodatuslaitteistolla käyttäen suodatin-kalvona Amiconin 100 kDa:n huokoskoon kalvoa. Ultrasuodatusyksikköön luotiin ylipaine käyttämällä typpikaasua. Suodatusyksikköön syötettiin typpeä noin 1,5 bar paineella. Sekoitus asetettiin 300 rpm:ään magneettisekoittimella. Ultrasuodatuksen jälkeen konsentraattia jäi 2 ml ja permeaattia syntyi noin 17 ml.

Konsentroidin perään tehtiin puskurinvaihto 1 x PBS-puskuriin. Ensin lisättiin 1 x PBS:ää noin 100 ml, joka konsentroidiin noin 2 ml:ksi. Tämän jälkeen lisättiin noin 80 ml 1 x PBS:ää, joka konsentroidiin noin 5 ml:ksi. Ennen konsentroidintia lyaattia oli noin 19,5 ml ja konsentroidin jälkeen noin 5 ml, eli konsentroidintikertoimeksi saatiin x 4. Tämän jälkeen konsentraatille tehtiin uusi InB-NP:n vasta-ainemääritys. Konsentroidun näytteen puhdistusta jatkettiin geelisuodatuksella.

### 3.6 Geelisuodatus

Geelisuodatuksessa käytettiin XK 26/100 pylvästä, joka oli pakattu Sephacryl S-1000 -matriisilla. Matriisia oli pylväessä 530 ml. Pylväs kiinnitettiin Äkta Explorer-kromatografialaitteeseen. Ajossa käytettiin PBS-puskuria. Näyte injektoidiin 4

ml:n letkuluuppiin lääkeruiskua käyttäen. Geelisuodatusajossa käytetyt parametrit olivat:

- tasapainotus: 2 CV
- virtausnopeus: 2,5 ml/min
- aallonpituus: 280 nm
- näyteluupin tyhjennys: 5 ml
- eluutiofraktioiden koko: 10 ml
- eluution pituus: 1,2 CV

Ajossa käytettiin jäähdytystä pumpppaamalla jäävettä pylvään vaippaan. Kromatogrammin fraktioista tehtiin TR-FIA-mittaus, jonka jälkeen parhaat fraktiot konsentroitiin.

### 3.7 Konsentroidi ultrasuodatuksella (Amicon Ultra)

Geelisuodatuksen ja TR-FIA-mittausten jälkeen kolme eniten kohdeproteiinia sisältävää fraktiota konsentroitiin erikseen ultrasuodatuksella. Suodatukseseen käytettiin Milliporen Amicon Ultra 30 K Centrifugal filter Devices -suodattimia 30 000 kDa kalvolla. Suodattimien maksimi täyttömäärä oli 4 ml. Jokaisesta fraktiosta pipetoitiin kuitenkin kaikki 10 ml eli suodatus tehtiin kolmessa erässä. Suodatus tehtiin sentrifugoimalla suodatinputkia Heraeus Sigma 6K15 sentrifugilla ja swing-out-roottorilla 4000 g:ssä noin 10 minuuttia. Kunkin fraktion konsentroiduksi lopputilavuudeksi tuli noin 550 µl. Konsentraateista mitattiin myöhemmin kokonaisproteiinimäärät ja InB-NP-määrät. Lisäksi konsentraateista tehtiin myös kvalitatiiviset SDS-PAGE ja Western blot -määritykset.

### 3.8 Influenssa B -viruksen nukleoproteiinin tunnistaminen TR-FIA-menetelmällä (eng. time-resolved fluoroimmunoassay)<sup>5</sup>

Jokaista mitattavaa näytettä käytettiin 110 µl laimennossuhteilla 1/10, 1/50 tai 1/100. Laimennokset pipetoitiin Delfia Multibuffer -puskuriin (Wallac Oy, Turku,

Suomi). Tämän lisäksi valmistettiin leima-ainetta sisältävää vasta-ainetta ( $\alpha$ -InB Eu) Multibuffer-puskuriin suhteessa 1/1000.

Näytteiden valmistamisen jälkeen vasta-aineilla päällystetyt kuoppalevyrivit pestiin 1 x Delfia wash -pesupuskurilla (Wallac Oy) kuoppalevypesuria käyttäen. 96-kuoppalevyt oli etukäteen päällystetty anti-InB-NP-vasta-aineella (0,25  $\mu$ g/kuoppa).

Laimennetut näytteet pipetoitiin pestylle kuoppalevyille. Kuoppiin lisättiin vielä yllä mainittua leimavasta-ainetta 50  $\mu$ l per kuoppa. Kuopat peitettiin ja levyä inkuboitiin 37 °C 1 h ajan. Inkuboinnin jälkeen levyt pestiin kahdeksan kertaa samalla 1 x Delfia wash -puskurilla. Pesun jälkeen kuoppiin lisättiin 150  $\mu$ l Delfia enhancement-liuosta (Wallac Oy).

Viimeiseksi levyltä mitattiin europiumin tuottama fluoresenssi käyttäen Europium TRF -ohjelmaa kuoppalevynlukulaitteella (Hidex Sense microplate reader).

Työssä tehtiin TR-FIA-mittauksia jokaisen kromatografia-ajon jälkeen fraktioista, jotka osuivat kromatogrammin piikkeihin. Mittauksia tehtiin myös kaikkien muiden puhdistus- tai konsentroitivaiheiden jälkeen, jotta puhdistuskerroin ja spesifinen aktiivisuus voitiin määrittää prosessin eri vaiheista.

### 3.8.1 Kuoppalevyjen päällystäminen (coating)

Kuoppalevyn kuoppien vasta-ainemääräksi laitettiin 0,25  $\mu$ g/kuoppa. Päällystykseen käytettiin anti-InB-NP-vasta-ainetta, joka laimennettiin 50 mM pH 9,6 natriumkarbonaattipuskuriin ( $\text{Na-CO}_3$ ). Valmistettua päällystysliuosta pipetoitiin monikanavapipetillä 240  $\mu$ l per kuoppa. Pipetoinnin jälkeen kuoppalevyjä pidettiin huoneenlämmössä noin 24 h ajan.

Seuraavana päivänä kuoppalevyt pestiin kahteen kertaan TR-FIA-pesuliuksella (1 x Delfia wash, Wallac Oy). Pesun jälkeen kuoppiin pipetoitiin monikanavapipetillä saturointiliuosta 250  $\mu$ l per kuoppa. Saturointiliuos koostui kantaliuoksesta (50 mM Tris pH 7,75 + 9 % NaCl + 0,05 %  $\text{NaN}_3$ ), johon liuotet-

tiin vielä 0,1 % gelatiinia (DIFCO gelatin). Pipetoinnin jälkeen kuoppalevyt peitettiin teipillä ja säilytettiin jääkaapissa 4 °C:ssä.

### 3.9 BCA-mittaus kokonaisproteiinikonsentraation määrittämiseksi

BCA-mittaus tehtiin puhdistuksen jokaisesta välivaiheesta kokonaisproteiinikonsentraation määrittämiseksi. Konsentraatiot mitattiin näytteestä ennen puhdistusvaihetta ja puhdistuksen jälkeisestä näytteestä.

Määrittämiä varten valmistettiin BSA-standardit (Bovine serum albumin, BSA). Standardeja valmistettiin BSA-liuoksesta, jonka konsentraatio oli 10 mg/ml. Tätä laimennettiin veteen siten, että saatiin standardisuora konsentraatiopisteillä 1500, 1000, 750, 500, 250, 125, 50 ja 25 µg/ml. Myös mitattavat näytteet laimennettiin osumaan mittausalueelle.

BCA-mittauksessa laimennettuja näytteitä pipetoitiin ensin 25 µl per kuoppa 96-kuoppalevyille. Tämän jälkeen kuoppiin pipetoitiin 200 µl ohjeiden mukaan valmistettua WR-puskuria. Seuraavaksi levyä ravisteltiin noin 30 sekuntia ja inkuboitiin 30 min 37 °C:ssä. Levyn jäähtyttyä mitattiin absorbanssi 562 nm:ssä Hidex Sense microplate reader -laitteella. Laitteeseen oli asennettu ohjelma laskemaan konsentraatio suoraan standardien pohjalta.

### 3.10 SDS-PAGE

SDS-PAGE:ssa käytettiin valmiita Bio-Rad Mini Protean TGX Precast 4-15 % geelejä. Näytteet laimennettiin 6 x Laemmliin puskuriin. Laimentamisen jälkeen näytteitä inkuboitiin 85 °C:ssä 4 min ja sentrifugoitiin 16 000 g:ssä yhden minuutin ajan pöytäseentrifugilla. Ajolaitteena käytettiin Bio-Radin ajolaitetta ja puskurina 1 x SDS-ajopuskuria. Geeli ajettiin 200 voltilla noin 30 min ajan. Proteiinimarkkerina käytettiin Bio-Radin Precision Plus Protein Dual Color Standards -markkeria. Geelejä tehtiin kaksi rinnakkaista, toinen Western blot -määrittystä varten ja toinen värjäykseen. Toinen geeli värjättiin ajon jälkeen Aqua Stain -liuoksella ja toista geeliä käytettiin Western blot -menetelmässä.



### 3.11 Western blot -menetelmä

Western blot -menetelmässä SDS-PAGE-geelistä siirrettiin proteiinibändit Immun-blot PVDF-kalvolle 100 V jännitteellä yhden tunnin ajan käyttäen Bio-Rad Criterion blotter -laitteistoa. Siirron jälkeen kalvot siirrettiin blokkauksreagenssiin, joka oli 5 % maitojauheliuos 1 x PBS-puskurissa.

Blokkauksen jälkeen kalvolle tehtiin ensimmäinen vasta-ainekäsittely. Ensimmäisenä vasta-aineena käytettiin HyTest Anti-Influenza B-vasta-ainetta, joka oli laimennettu 1 % maitoliuokseen suhteessa 1/3000. Käsittely tehtiin huoneenlämmössä ravistelijassa yhden tunnin ajan. Käsittelyn jälkeen kalvot pestiin 1 x PBST-puskurissa kaksi kertaa viisi minuuttia ravistelussa.

Pesun jälkeen suoritettiin toinen vasta-ainekäsittely. Kakkosvasta-aineena käytettiin Bio-Rad Goat Anti-Mouse IgG (H+L) AP konjugaattia, joka oli laimennettu suhteessa 1/10000 1 % maitoliuokseen, jossa kalvoa käsiteltiin 1h huoneenlämmössä. Käsittelyn jälkeen kalvo pestiin PBST-puskurissa.

Pesujen jälkeen suoritettiin AP-detektio lisäämällä kalvon päälle AP-detektiopuskuri NBT/-BCIP-yhdistelmää. Kalvoa kehitettiin noin 24 minuuttia ja kehittäminen pysäytettiin ultrapuhtaalla vedellä. Kalvon kuivumisen jälkeen kalvot analysoitiin visuaalisesti onko näytteessä kohdeproteiinia vai ei. Kalvot valokuvattiin digitaalikameralla.

## 4 TULOSTEN TARKASTELU

Työn puhdistusprosessi koostui soluhajotuksesta, sentrifugoinnista, ioninvaihtokromatografiasta, ultrasuodattuksesta ja geelisuodattuksesta. Seuraavaksi esitetään työn eri vaiheiden tuloksia, erityisesti kromatografisten ajojen tuloksia, jotka koostuvat matriisien sitomiskapasiteeteista, spesifisestä aktiivisuudesta ja saannosta. Ensimmäisenä vertaillaan 1 ml pylväillä tehtyjen anioninvaihtotestiajojen tuloksia toisiinsa. Testiajojen tuloksien perusteella valittiin soveltuvin matriisi ja pH-alue suuremman 20 ml pylvään ajoja varten. Suuremmalla 20 ml pylväällä suoritettiin kolme ajoa, joista kahdessa ensimmäisessä ajossa injektotavana näytemääränä käytettiin 4 ml tilavuutta ja kolmannessa ajossa 20 ml näytetilavuutta. Jatkopuhdistusprosesseina suoritettut ultrasuodatus- ja geelisuodatusvaiheet tehtiin ainoastaan viimeisen 20 ml näytemäärän IEX-ajon jälkeen.

Viimeiseksi koko puhdistusprosessista esitetään puhdistuskaavio, josta voidaan nähdä prosessin aikana näytteistä lasketut spesifiset aktiivisuudet ja saannot.

### 4.1 Ioninvaihtokromatografia

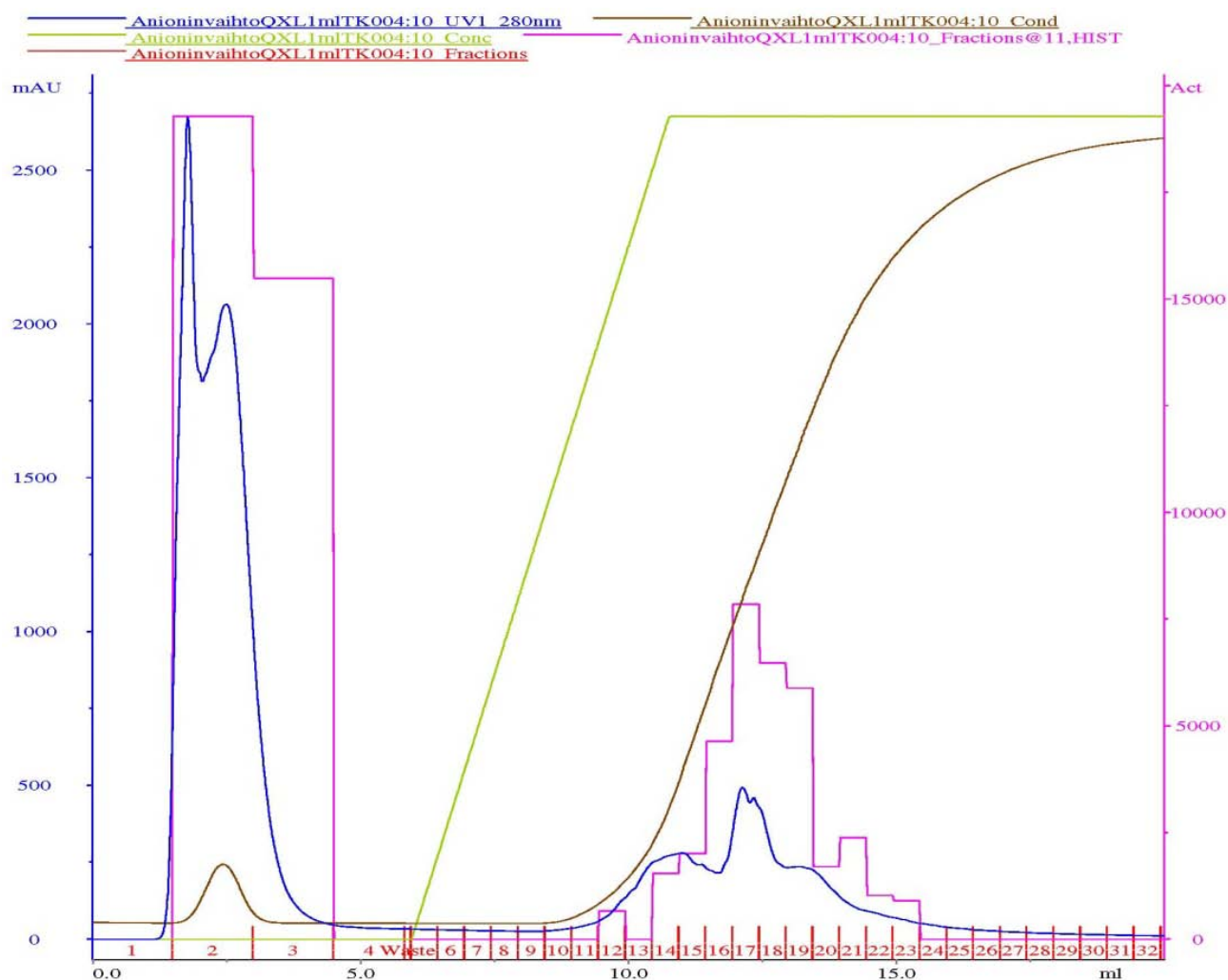
#### 4.1.1 Matriisin valinta

Työssä suoritettiin kaikkiaan 25 ioninvaihtoajoa, joista 22 ensimmäistä oli testiajoja yhden millilitran pylväillä. Jokaisesta testiajosta tehtiin TR-FIA-mittaus FT- ja eluutiofraktioista. Fraktioiden InB-NP-pitoisuudet yhdistettiin ajojen kromatogrammeihin aktiivisuushistogrammeina. Näin eri ajojen kromatogrammeja ja puhdistustehokkuutta voitiin vertailla toisiinsa. TR-FIA-mittauksen pohjalta saatiin myös laskettua eri ajojen pylväille sitomiskapasiteetit verrattaessa FT:n ja eluution InB-NP-määriä toisiinsa. Seitsemän parhaan ajon tulokset taulukoitettiin seuraavasti:

Taulukko 1. Anioninvaihtoajojen sitomiskapasiteetit 1 ml testipylväillä.

Matriisi	Ajon pH-olosuhde	FT- lukemat / 3ml	Eluution lukemat /6ml	Kok. lukemat (FT + eluutio) / 9 ml	FT:ssa läpi (%)	Kiinni pylväässä (%)	Häviää ajossa (lukem)	Häviää ajossa (%)	Järj.
Q XL	6	34785	35070	69855	50 %	50 %	-743	-1 %	1
Q XL	7	77550	31705	109255	71 %	28 %	2732	2 %	2
ANX	9	99935	28815	128750	73 %	21 %	8400	6 %	3
ANX	8	386910	93765	480675	80 %	20 %	-145438	-43 %	4
ANX	7	98720	21947	120667	82 %	18 %	-8679	-8 %	5
DEAE FF	8	332100	66800	398900	83 %	17 %	-63663	-19 %	6
Q FF	7	102965	19973	122938	84 %	16 %	-10950	-10 %	7

Taulukon 1 tulokset pohjautuvat TR-FIA-mittauslukemiin. Mittauksissa on huomioitu laimennokset ja fraktioiden tilavuudet. Taulukosta voidaan huomata, että Q Sepharose XL - ja ANX FF -matriisit toimivat parhaiten puhdistuksessa; etenkin Q XL-matriisi pH 6 -olosuhteissa. "Häviää ajossa" -sarake kuvaa kuinka paljon lähtönäytteen lukemat eroavat FT:n ja eluution summatuista totaaliaktiivisuuksista. Taulukon 1 tuloksista vain ANX pH 4 -ajossa esiintyy selkeää ristiriitaa lähtönäytteen ja kokonaislukemien välillä, eli aktiivisuutta olisi selkeästi enemmän FT:ssa ja eluutiossa kuin lähtönäytteessä. Muissa ajoissa ero johtuu todennäköisesti TR-FIA-mittauksen virheestä. Edellä on vielä kuvattu parhaan 1 ml Q XL -pylvään ajon kromatogrammi aktiivisuushistogrammin kanssa:



Kuva 1. Kromatogrammi IEX-ajosta pH 6:ssa 1 ml Q XL -pylväessä.

Kuvan 1 sininen käyrä kuvaa ajon absorbanssia 280 nm:ssa. Violetti histogrammi kuvaa fraktioiden aktiivisuutta. Ruskea käyrä kuvaa gradientin johtokykyä. Y-akselin vasen reuna (sininen) kuvaa absorbanssia 280 nm:ssa ja oikea reuna (violetti) fraktioiden kokonaisaktiivisuutta.

Kuvan 1 aktiivisuushistogrammissa jokainen pylväs kuvaa kyseisen fraktion kokonaisaktiivisuutta, jossa fraktion tilavuus on huomioitu, eli fraktion InB-NP-konsentraatio on kerrottu fraktion tilavuudella. InB-NP-konsentraatiot saatiin TR-FIA-mittauksesta.

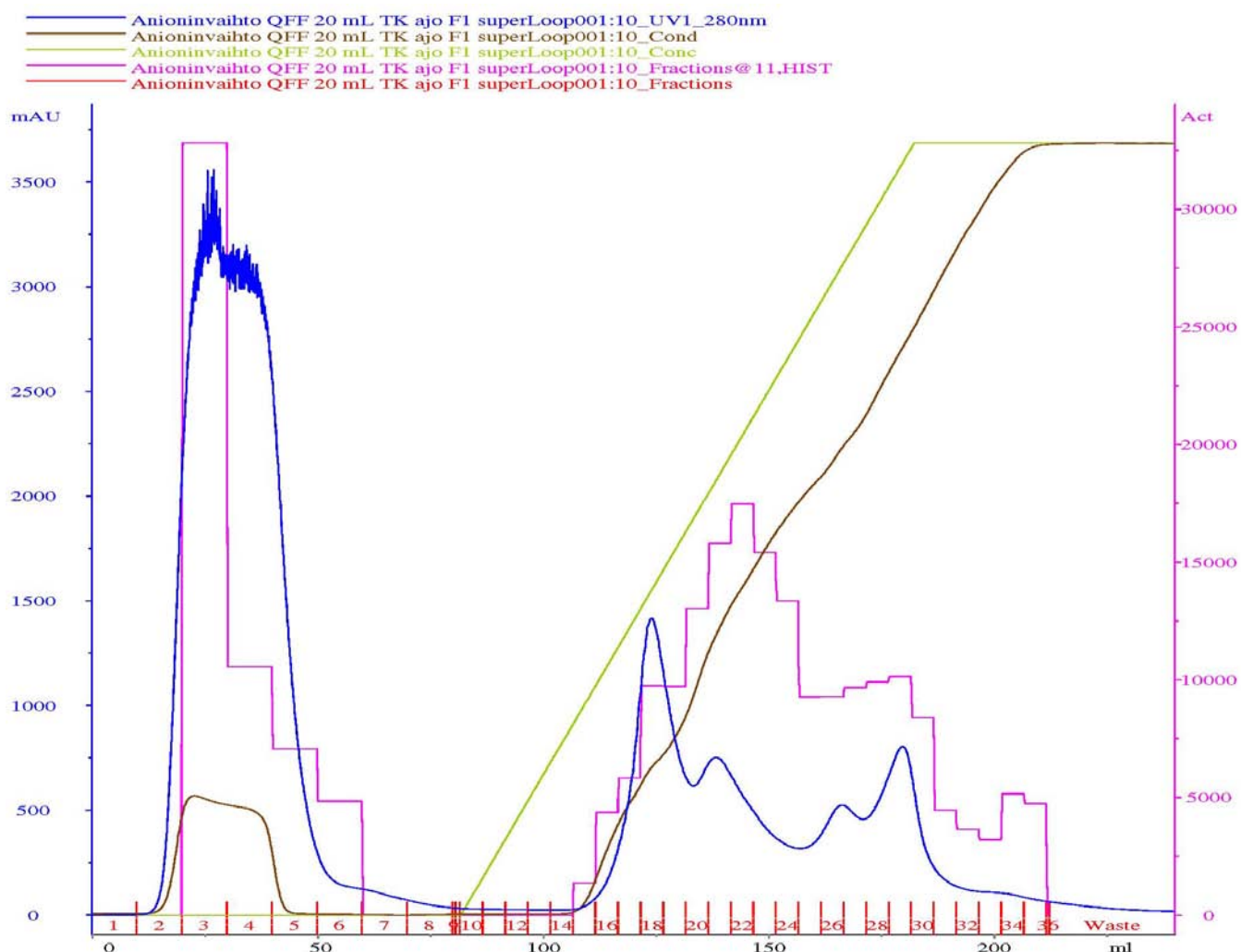
1 ml pylväiden testiajojen jälkeen siirryttiin käyttämään suurempaa 20 ml kolonnia. 20 ml pylvään matriisiksi valittiin työjärjestykseen liittyvistä syistä johtuen Q

FF -matriisi, vaikka Q XL -matriisilla saatiin testiajoissa selkeästi parempia tuloksia. Kyseisissä 20 ml Q FF -pylvään ajoissa käytettiin pH 7-olosuhteita.

#### 4.1.2 Suuren mittakaavan anioninvaihdon kromatogrammi, fraktioiden aktiivisuudet ja sitomiskapasiteetti

Työssä suoritettiin kolme ajoa 20 ml pylväällä; kaksi 4 ml näyteinjektiolla, jota seurasi yksi ajo 20 ml näyteinjektiolla, koska 4 ml näytteen ajoissa saannot jäivät liian alhaisiksi jatkopuhdistusta ajatellen. Seuraavaksi esitetään tuloksia 20 ml Q FF -matriisipylväällä ja 20 ml näyteinjektiolla suoritetusta ajosta. Pylvään kohdeproteiinin sitomiskapasiteetti saatiin määritettyä käyttämällä ajon fraktioista saatujen TR-FIA-testin tuloksia.

Kromatogrammin eluutio- ja FT-fraktioista tehtiin TR-FIA-mittaukset InB-NP-pitoisuuden määrittämiseksi. Mittaukseen valittiin FT-fraktiot 3-6 ja eluutiofraktiot 15-36 (Kuva 2.). Mittaustuloksien avulla saatiin määritettyä kuinka paljon kohdeproteiinia kiinnittyy pylvääseen ja miten kiinnittyneet proteiinit irtoavat matriisista. TR-FIA-mittaustulokset yhdistettiin histogrammina kromatogrammin päälle, jolloin kromatogrammista nähtiin paremmin kohdeproteiinin irtoaminen ja kiinnittyminen matriisissa. TR-FIA-mittaustulokset ovat liitteessä 3.



Kuva 2. Kromatogrammi anioninvaihtoajosta, johon on yhdistetty TR-FIA-mittauksen histogrammi.

Kuvassa 2 sininen käyrä kuvaa absorbanssia 280 nm:ssä. Violetti histogrammi kuvaa fraktioiden aktiivisuutta. Ruskea käyrä kuvaa gradientin johtokyvyn nousua. Vihreä viiva kuvaa gradientin konsentraation tavoitetta. X-akselilla olevat punaiset numerot kuvaavat fraktionumeroita. Y-akselin vasen reuna kuvaa mittauksen absorbanssia ja oikea reuna histogrammin aktiivisuutta.

Kuvan 2 aktiivisuushistogrammin pylväissä fraktioiden tilavuutta ei ole huomioitu. Jos tilavuudet olisi huomioitu (FT 10 ml ja eluutio 5 ml), eluutiofraktioiden aktiivisuuspylväiden korkeus olisi vain puolet kuvassa olevista, mikä vain vaikeuttaisi kuvan tulkitsemista.

Kromatogrammista voidaan huomata, että kohdeproteiini ei ole eluoinut yhdessä piikissä, vaan sitä on jakautunut myös muihin eluutiopiikkeihin. Tästä voidaan päätellä, että puhdistettava InB-NP ei ollut joko tuottanut yhdenkokoisena makromolekyylinä tai se oli hajonnut puhdistuksen aikana. Tällöin myös puhdistettavien makromolekyylien pintavaraus on erilainen, mikä johtaa useisiin ”aktiivisiin” piikkeihin. Kromatogrammin viimeisessä piikissä oli vielä aktiivisuutta, mikä kertoi osan kohdeproteiineista olleen kovemmin kiinni pylväässä valtaosaan nähden. Kromatogrammin piikit ovat myös melko leveitä ja laveita, eli ajon resoluutio ei ollut kovin korkea.

Kromatogrammin ja TR-FIA-mittauksen perusteella anioninvaihdon parhaat fraktiot yhdistettiin jatkopuhdistusta varten. Fraktiot 20-24 sisälsivät eniten kohdeproteiinia ja ne yhdistettiin yhdeksi näytteeksi jatkopuhdistusta varten.

TR-FIA-mittauksien avulla saatiin laskettua pylväälle sitomiskapasiteetti.

Taulukko 2. Anioninvaihdon sitomiskapasiteetti TR-FIA-mittauksen pohjalta.

Lukemat lähtönäyte / 20 ml	Lukemat FT / 40 ml	Lukemat eluutiosta / 90 ml	Totaalilukemat (FT + eluutio)	Häviää ajos- sa (lukemat)	Häviää ajossa (%)	Sitomis- kapasiteetti / saanto	FT:n osuus
2687000	552950	879400	1432350	1254650	47 %	33 %	21 %

Taulukon 2 tulokset laskettiin siten, että TR-FIA-mittauksen (Liite 3.) InB-NP-konsentraatiot kerrottiin fraktion tai näytteen tilavuudella esim. eluutiofraktion koko oli 5 ml eli InB-NP-konsentraatio kerrottiin viidellä. Yksittäisten eluutio- ja FT-fraktioiden totaalilukemat laskettiin yhteen (FT-fraktiot 3-6 ja eluutiofraktiot 15-36). Näitä summattuja arvoja voitiin verrata lähtönäytteen totaalilukemiin, jolloin saatiin laskettua ajon sitomiskapasiteetti ja häviöprosentti. Sitomiskapasiteetti saatiin jakamalla eluution lukemat lähtönäytteen lukemilla, eli lukemat eluutiosta / lukemat lähtönäyte. Taulukosta voidaan huomata, että ”häviää ajossa” -lukemia, eli FT:n ja eluution yhteenlasketut lukemat, jäävät selvästi alhaisemmiksi (47 %) lähtönäytteen totaaliaktiivisuudesta. Tämä saattoi johtua esimerkiksi siitä, että kohdeproteiinia oli irronnut myös niissä fraktioissa, joita ei mitattu TR-FIA-testillä. Todennäköisempää on kuitenkin, että puhdistuksen ede-

tessä näytteen InB-NP-aktiivisuus laski olosuhdemuutoksien seurauksena esim. lämpötilan nousu ja konsentraation muutos, tai TR-FIA-mittausvirheen takia. On myös mahdollista, että ero johtuu siitä, että kohdeproteiinia on jäänyt pylväseen ajon päätyttyä. Tämä on kuitenkin epätodennäköistä, jos tarkastellaan 1 ml testiajon saantoa (16 %) kyseisellä matriisilla ja pH:lla.

Sitomiskapasiteetiksi saatiin 33 %, kun fraktioiden 15-35 lukemat laskettiin yhteen. Sitomiskapasiteetti oli siis selkeästi parempi kuin pienen 1 ml koeajossa, jossa sitomiskapasiteetiksi saatiin vain 16 %. Ajosta olisi saatu todennäköisesti parempi tulos, jos olisi käytetty jotain toista testattua matriisia esim. Q XL:ää. Ajosta tehtiin myöhemmin SDS-PAGE- ja Western blot -analyysit, joihin valittiin näytteiksi IEX-lähtönäyte sekä fraktiot 3, 18, 20, 22, 24, 26, 29, 31 ja 34 (Kuva 6.). Yksittäisistä fraktioista ei tehty kokonaisproteiinikonsentraatiomääritystä, joten yksittäisten fraktioiden spesifistä aktiivisuutta ei voida esittää tarkasti. Kromatogrammista saa kuitenkin pääteltyä absorbanssin perusteella, missä piikissä on eniten proteiinia. Korkein aktiivisuus kohdistuu piikkiin, joka on fraktioiden 20-23 kohdalla ja absorbanssi on arvossa 750 mAU.

#### 4.2 Konsentroidi ja puskurinvaihto

Ioninvaihtoa jatkettiin konsentroidinnilla ja puskurinvaihdolla, jotta näyte voitaisiin jälkikäsitellä geelisuodatuksella. Seuraavaksi esitetään ioninvaihdon jälkeiselle näytteelle tehdyn ultrasuodatuksen tuloksia. Ultrasuodatuksen liittyvistä näytteistä tehtiin TR-FIA- ja BCA-mittaus, jotta vaiheesta saataisiin spesifinen aktiivisuus, puhdistuskerroin ja saanto.

Anioninvaihdon parhaiden fraktioiden yhdistettyä näytettä muodostui yhteensä 20 ml. Konsentroidinnin jälkeen näytteen tilavuus oli 5 ml. Tilavuuden alenemiskertoimeksi saatiin  $20 \text{ ml} / 5 \text{ ml} = 4$ , eli näyte konsentroitui x 4. Konsentraatille ja konsentroidinnin lähtönäytteelle tehtiin TR-FIA-mittaus sekä BCA-mittaus. Mittaustulokset ovat liitteissä 2 ja 4. Mittaustuloksien pohjalta tehtiin seuraavanlainen taulukko:



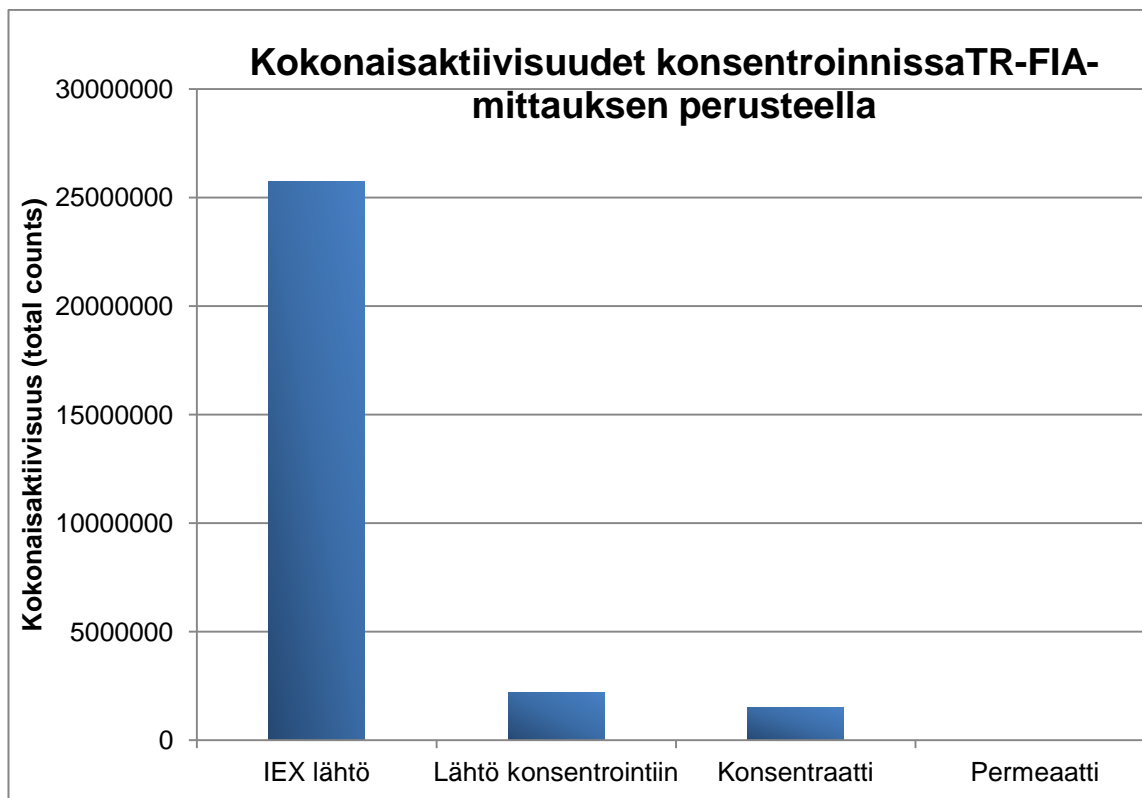
Taulukko 3. Konsentroidin spesifinen aktiivisuus, puhdistuskerroin ja saanto.

Näyte:	Totaali-aktiivisuus (lukemat)	Kokonais-proteiinit (mg)	Spesifinen aktiivisuus (lukemat/mg)	Puhdistus kerroin	Saanto (%)
IEX-lähtö	25725000	271	94926	n/a	100 %
IEX yhd. frak.	2206000	41,4	53285	0,56	9 %
Konsentraatti	1484585	25,1	59147	0,62	6 %

Taulukosta 3 voidaan huomata, että InB-NP-totaaliaktiivisuus laski jokaisessa vaiheessa, mutta konsentroidin spesifinen aktiivisuus nousi.

Tarkasteltaessa pelkkää konsentroidinvaihetta, voidaan huomata, että kokonaisaktiivisuus laskee arvosta 2 206 000 arvoon 1 484 583, eli saanto on noin 67 %. Yksi syy saannon laskuun voi olla lämpötilan nousu. Lämpötila oli vaikea pitää alhaisena, koska jäähdytys tapahtui pelkästään suodatinlaitteen päälle ja ulkoreunoille asetetuilla kylmäpakkauksilla. Ultrasuodatuksessa pääsi myös muodostumaan vaahtoa, mikä saattoi myös selittää saannon laskun. Toisaalta näytteessä nousi sekä InB-NP-konsentraatio että spesifinen aktiivisuus, mikä kertoo konsentroidin puhdistaneen näytettä.

Kuvassa 3 on vielä kuvattu pylväsdiagrammin avulla konsentroidiin liittyvät tulokset mittauksien ja taulukon 3 perusteella.



Kuva 3. InB-NP:n TR-FIA-mittausignaalit konsentroidin eri vaiheista. Kuvan pylväissä on huomioitu näytteiden laimennokset ja tilavuudet.

Kuvassa 3 jokainen pylväs kuvaa eri puhdistusvaiheen totaaliaktiivisuutta. Totaaliaktiivisuudet laskettiin seuraavasti: lukema/ml \* näytteen totaalitylisyys, eli InB-NP-konsentraatio kerrottiin näytteen sen hetkellä kokonaistilavuuella.

Yllä olevista tuloksista voidaan vielä todeta, että jo ioninvaihdossa totaaliaktiivisuus laski vielä enemmän kuin taulukossa 2. Tämä ristiriita saattaa johtua siitä, että konsentroidin jälkeen tehtiin uusi TR-FIA-mittaus, jossa IEX-ajojen yhdistettyjen fraktioiden aktiivisuudeksi saatiin selkeästi alhaisempi arvo, kuin heti IEX-ajon jälkeen lasketussa eluutiofraktioiden summassa. Eli jälkimmäisessä TR-FIA-mittauksessa fraktiot oli yhdistetty samaan putkeen, josta näyte otettiin. Tämä aktiivisuuden lasku mittauksien välillä saattoi selittyä sillä, että kohdeproteiini ei kestänyt ajon jälkeistä olosuhdemuutosta esim. konsentraation, lämpötilan tai pH:n muutosta. Toinen syy voi olla, että TR-FIA-mittauksien välillä oli yleensäkin eroa. Mittauksien välillä kului myös muutamia päiviä, jolloin olosuhdemuutokset ehtivät vaikuttamaan näytteen aktiivisuuteen.

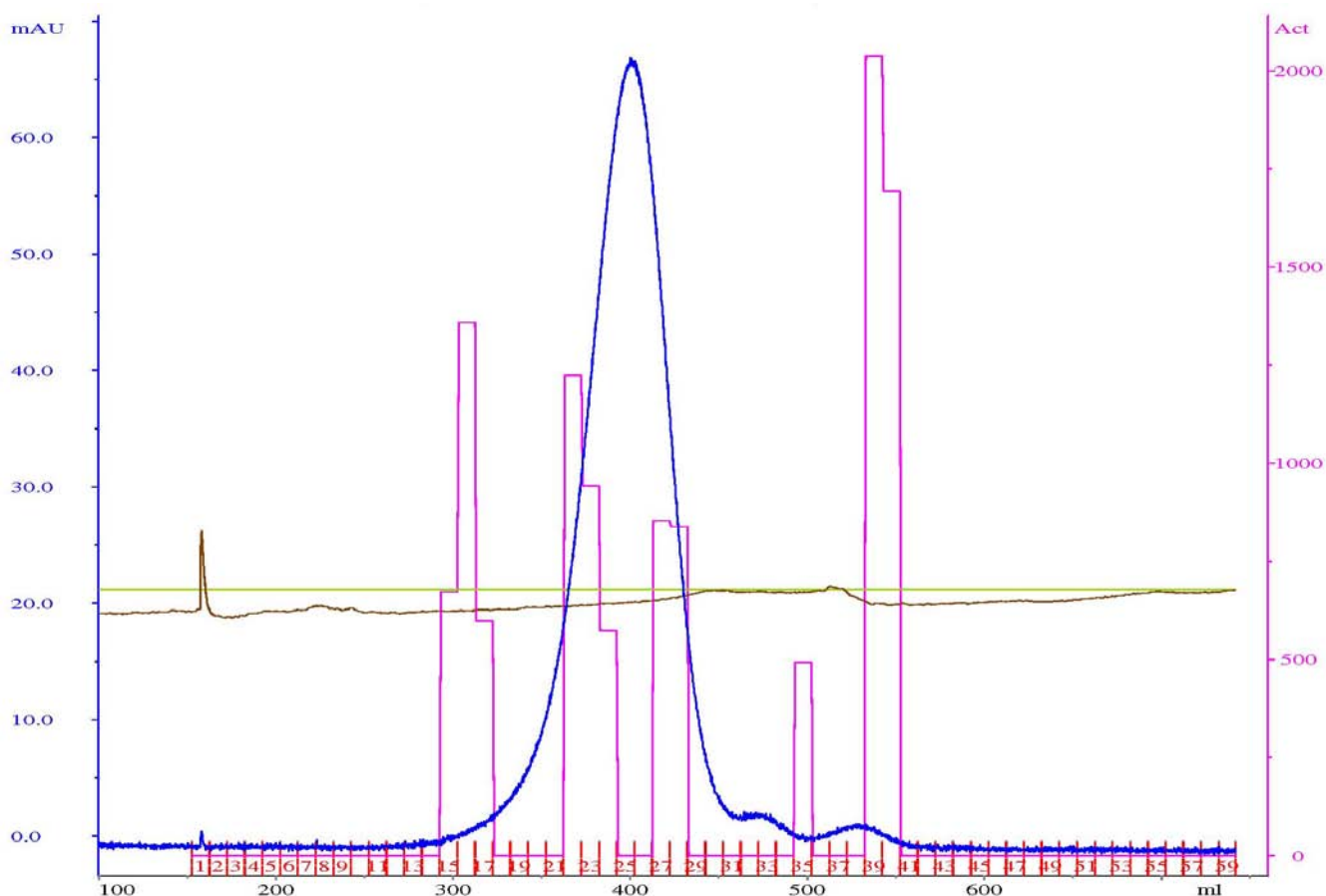
### 4.3 Geelisuodatus

Seuraavaksi tarkastellaan konsentroitua seuranneen geelisuodatuksen tuloksia. Ensin kuvataan hieman käytetyn matriisin ominaisuuksia ja ajoteknisiä asioita, minkä jälkeen kuvataan geelisuodatuksen tuloksia kromatogrammin ja TR-FIA-mittauksen perusteella. Geelisuodatuksessa käytettiin Sephacryl S-1000 -matriisia, jota oli pylväässä 530 ml. Ultrasuodatettua näytettä syötettiin 4 ml.

Sephacryl S-1000 -matriisi pystyy erottelemaan DNA:ta 20 000 emäspariin asti, dekstraaneja molekyylipainoltaan  $10^5$  -  $10^{8,5}$ , sekä pallon muotoisia partikkeleita 400 nm:in asti. Sephacryl S-1000 on tuoteperheen suurin matriisi, eli sen matriisihelmet ovat halkaisijaltaan suurimpia.<sup>11</sup>

Ennen varsinaista geelisuodatusta olisi hyvä suorittaa kalibrointiajo kokostandardeilla. Tällöin kromatogrammin piikeille saataisiin määritettyä molekyylimassat. Käytettäessä standardia, ajojärjestelyitä ei tulisi enää muuttaa siirryttäessä ajamaan varsinaista näytettä, jotta varsinaisen ajon ja kalibrointiajon piikkejä voitaisiin verrata toisiinsa. Kun piikkejä verrataan toisiinsa, näytteestä voidaan laskea kohdeproteiinin molekyylimassa. Standardien avulla kromatogrammista voidaan löytää myös suoraan kohdeproteiinia sisältävän piikki, jos sen molekyylipaino tai koko tunnetaan entuudestaan. Tässä työssä kalibrointiajoa ei kuitenkaan suoritettu työjärjestelyihin liittyvien syiden takia.<sup>11,12</sup>

Geelisuodatksesta saatiin kromatogrammi, jossa oli yksi selkeä piikki ja kaksi todella matalaa piikkiä. Kromatogrammin piikkeihin osuvista fraktioista 15-42 tehtiin TR-FIA-mittaus, jotta kohdeproteiinin irtoamispiikki saataisiin selville. TR-FIA-mittauksen lukemat olivat hyvin alhaisia ja lähellä taustan arvoa kaikissa fraktioissa. Tämä saattaa selittyä sillä, että saanto oli jo edeltävän konsentroidin jäljiltä todella pieni. Kuvassa 4 on vielä kuvattu TR-FIA-mittaustulokset aktiivisuushistogrammina kromatogrammin päällä.



Kuva 4. Geelisuodatuksen kromatogrammi ja TR-FIA-mittauksen histogrammi.

Kuvan 4 sininen käyrä kuvaa absorbanssia 280 nm:ssä. Violetit pylväät kuvaavat fraktioiden TR-FIA-mittauksen lukemia. X-akselin punaiset numerot kuvaavat fraktioiden numeroa. Vihreä viiva kuvaa eluutiogradientin konsentraatiota (isokraattinen eluutio). Ruskea käyrä kuvaa eluution todellista johtokykyä. Y-akselin vasen reuna kuvaa mittauksen absorbanssia ja oikea reuna histogrammin aktiivisuutta.

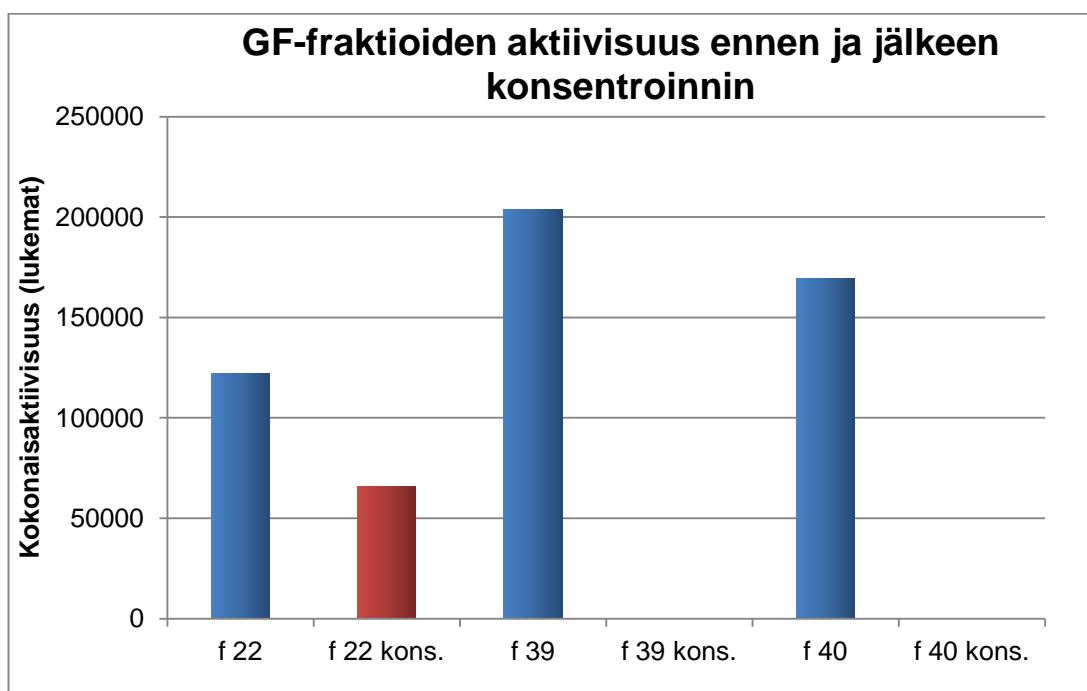
Geelisuodatuksen TR-FIA-mittaukset ovat liitteessä 5. Mittauksen lukemat jäivät todella mataliksi, mikä kertoo kohdeproteiinin hävinneen lähes kokonaan puhdistuksen aikana. Kromatogrammin piikeistä voitiin myös huomata, että kokonaisproteiinikonsentraatiokin oli hyvin alhainen (alle 70 mAU).

Geelisuodatuksesta valittiin vielä kolme parasta fraktiota kromatogrammin ja TR-FIA-mittauksetulosten perusteelle (Kuva 4. ja Liite 5.) viimeiseen konsentroidiin. Geelisuodatuksesta valitut fraktiot olivat 22, 39 ja 40.

#### 4.4 Konsentroidi ultrasuodatuksella (Amicon Ultra)

Geelisuodatuksen jälkeiset kolme fraktiota konsentroidiin vielä viimeiseksi ultrasuodatuksella. Kukin fraktio oli tilavuudeltaan ennen konsentroidi noin 10 ml. Konsentroidinnin jälkeen fraktioiden tilavuudeksi saatiin noin 550 µl, eli konsentroidikertoimeksi saatiin  $\times 18$ . Jokaisesta konsentroidusta fraktiosta tehtiin TR-FIA-mittaus, BCA-mittaus, SDS-PAGE- ja Western blot -analyysit.

Ultrasuodatuksen jälkeisistä TR-FIA-mittauksista voitiin todeta, että vain fraktiossa 22 oli kohdeproteiinia jäljellä. Fraktioiden 39 ja 40 InB-NP-määrät jäivät taustan kanssa samalle tasolle, joten niissä ei ollut enää kohdeproteiinia. Tästä voitiin päätellä InB-NP:n tulleen jo geelisuodatuksen alkuvaiheessa pylvästä läpi. TR-FIA-mittauksen tulokset ovat taulukoituina liitteessä 6.



Kuva 5. Geelisuodatuksen fraktioiden kokonaisaktiivisuudet ennen konsentroidiä ja sen jälkeen mitattuna TR-FIA:lla.

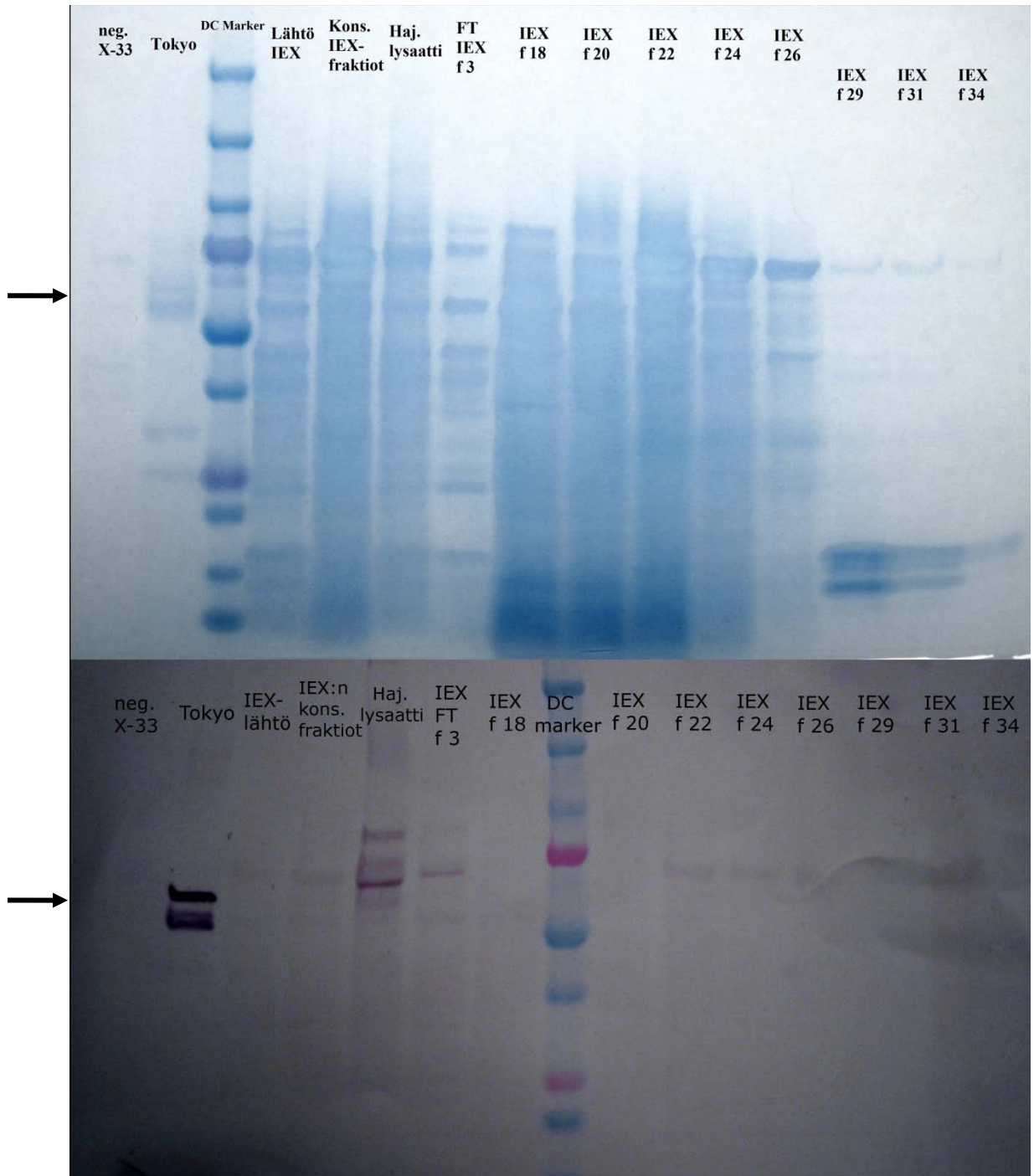
Kuvan 5 pylväiden aktiivisuudet laskettiin liitteiden 5 ja 6 pohjalta. Fraktion aktiivisuus laskettiin kertomalla aktiivisuuskonsentraatio (lukemat/ml) fraktion tilavuudella (ml). Kuvasta 5 voidaan todeta, että vain fraktio 22 sisältää konsent-

roinnin jälkeen puhdistettavaa InB-NP:a. Kuvan 4 kromatogrammissa geelisuodatuksen fraktioiden 39 ja 40 aktiivisuuspylväät näyttävät olevan korkeammat kuin fraktion 22, mutta todellisuudessa TR-FIA-mittauksessa arvot olivat hyvin lähellä taustaa ja ero voi siis johtua mittausvirheestä.

#### 4.5 SDS-PAGE- ja Western blot -tulokset

SDS-PAGE ja Western blot -analyysit tehtiin näytteille, jotka olivat peräisin isommasta anioninvaihtoajosta, konsentroiduista ja geelisuodatetusta näytteistä. Anioninvaihdosta geeleille laitettiin näytteiksi InB-NP:a sisältävä positiivinen kontrolli (Tokyo), proteiinimarkkeri (DC protein marker), ajon lähtönäyte, eluutiofraktiot 18, 20, 22, 24, 26, 29, 31 ja 35 (Kuva 6.) ja konsentroidut anioninvaihtoajon fraktiot.

Geelisuodatusajon geelillä ja kalvolla näytteinä olivat proteiinimarkkeri, positiivinen kontrolli (Tokyo), geelisuodatuksen lähtönäyte eli konsentroidut IEX-fraktiot ja geelisuodatuksen jälkeiset konsentroidut fraktiot 22, 39 ja 40 (Kuva 7.). Geeleistä ja kalvoista otettiin kameralla valokuvat, jotka muokattiin seuraavanlaisiksi:



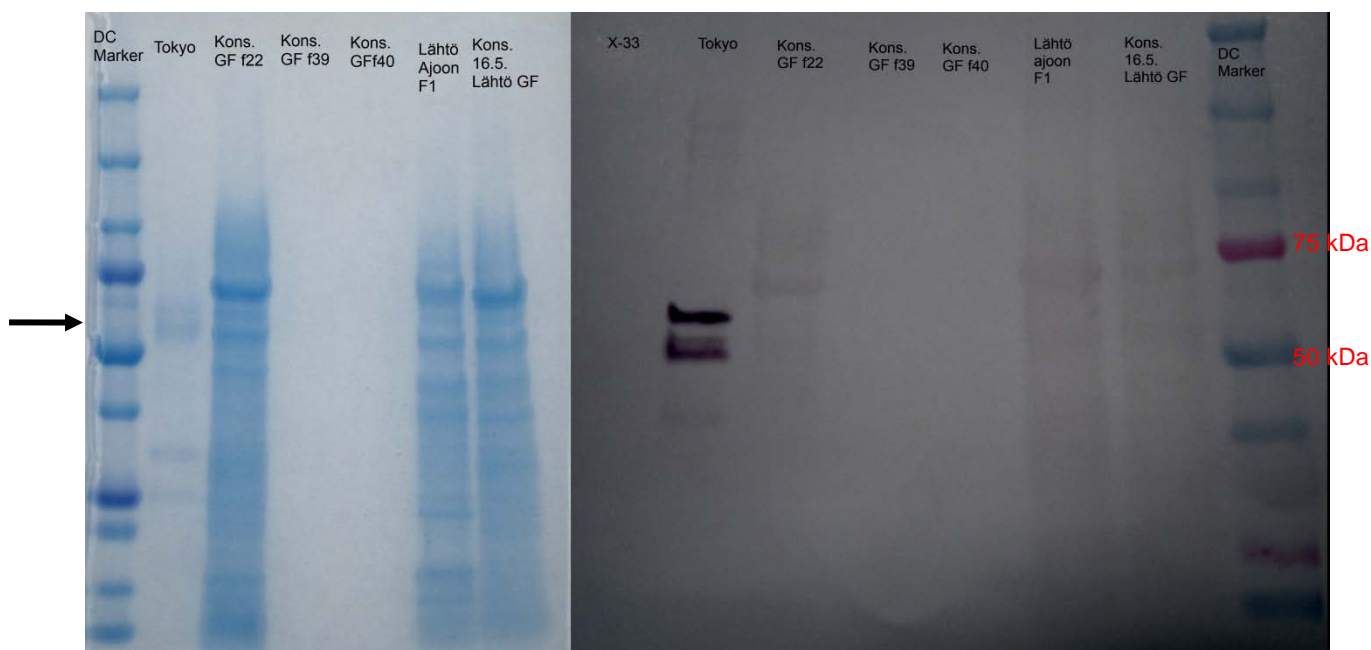
Kuva 6. SDS-PAGE- ja Western blot -kuvat suuren mittakoon IEX-ajon näytteistä.

Kuvassa 6 Tokyo on positiivinen kontrolli ja X-33 on negatiivinen kontrolli. InB-NP-bändit osuvat DC-markkerin 75 kDa (ylempi punertava bändi Western blot -kalvossa) ja 50 kDa bändien väliin.

Kuvasta 6 voidaan huomata, että suuremman mittakoon anioninvaihtoajon FT:ssa tuli kohdeproteiinia läpi, mikä kertoi, että IEX-pylvään sitomiskapasiteetti ei ollut riittävä tai se ei ole muuten kyennyt sitomaan kohdeproteiinia kokonaan.

Western blot -kalvosta voidaan myös huomata, että eluution fraktioiden bändit olivat hyvin heikkoja, mikä kertoi fraktioiden sisältävän hyvin pieniä määriä InB-NP:a. Kuvasta 6 voidaan myös huomata, että puhdistettavalla näytteellä InB-NP:n bändit olivat selvästi korkeammalla kuin positiivisella kontrollilla. Tästä voidaan päätellä, että puhdistuksen aikana proteiinit olivat muodostaneet eriko-koisia suurempia proteiiniaggregaatteja. Näin aggregaattien pintavarauksissakin saattoi olla eroja, mikä todettiin myös aiemmin IEX-ajon kromatogrammista ja ajon jälkeisen TR-FIA-mittauksen tuloksista (Kuva 2). InB-NP:n koko on noin 50 kDa, kun bändien asemaa verrataan DC-markeriin.

Myös geelisuodatuksen jälkeisistä kolmesta konsentroidusta fraktiosta tehtiin SDS-PAGE- ja Western- blot -analyysit:



Kuva 7. Geelisuodatuksen konsentroitujen fraktioiden SDS-PAGE-geeli ja Western blot -kalvo.



Kuvassa 7 vasen puoli kuvaa SDS-PAGE-geeliä ja oikea puoli Western blot -kalvoa. Molempien kaivo ”lähtö ajoon F1” tarkoittaa IEX-ajon lähtönäytettä. Musta nuoli vasemmassa reunassa osoittaa InB-NP-bändin kohdan kuvassa. Kuvan oikean reunan punaiset 75 kDa - ja 50 kDa -tekstit kuvaavat DC-markkerin kyseisiä bändejä.

Kuvasta 7 voidaan huomata, että geelisuodatuksen konsentroiduista fraktioista ainoastaan fraktio 22 sisälsi InB-NP:a, kuten myös jo aiemmat TR-FIA-mittaukset olivat osoittaneet. Kohdeproteiinin koko on noin 70 kDa, kun bändiä verrataan DC-markkeriin (punaista 75 kDa bändiä). Laskennalliseksi molekyylivälikooksi saatiin 82,5 kDa (Liite 1.), eli eroa laskennallisen ja todellisen näytteen molekyylipainon välillä oli noin 12,5 kDa.

Kaikissa geeleissä IEX- ja GF-ajon yksittäisten fraktioiden näytteet oli pipetoitu geelille laimentamattomina, joten fraktioiden bändejä ei olisi saatu enää näkyvämmiksi lisäämällä näytteen konsentraatiota. Muut näytteet esim. lähtönäytteet laimennettiin tarpeen mukaan esim. 1/10 tai 1/2.

#### 4.6 Puhdistuskaavio puhdistusprosessista

Seuraavaksi esitetään puhdistuskaavio koko puhdistusprosessista, eli puhdistumisen etenemistä aina soluhajotuksesta viimeiseen konsentroiintiin. Puhdistuskaavio kuvaa puhdistuksen tehokkuutta ja saantoa. Puhdistuskaavion (Taulukko 4.) laskuissa käytetyt näytteet olivat:

- soluhajotettu lymfaatti (18 ml)
- suuren anioninvaihtoajon lähtönäyte (22ml)
- anioninvaihdon yhdistetyt fraktiot (20 ml)
- ultrasuodatuksen jälkeinen konsentraatti (5 ml)
- geelisuodatuksen fraktionumero 22 (10 ml)
- GF-fraktionumeron 22 konsentraatti (0,55 ml)

Puhdistuskaavion laskutoimituksissa käytettiin sekä BCA-mittaustuloksia (Liite 2.) että TR-FIA-mittaustuloksia. Myös eri puhdistusvaiheiden jälkeisiä tilavuuksia tarvittiin laskuissa.

Taulukko 4. Puhdistuskaavio puhdistusprosessista.

	Totaali tilavuus (ml)	Kokonaisprot.-konsentraatio (mg/ml)	Totaali proteiinit (mg)	Aktiivisuus (counts/ml)	Totaali aktiivisuus (counts)	Spesifinen aktiivisuus (counts/mg)	Puhdistuskerroin	Saanto (%)
Hajotus (lys.)	18	31,87	573,7	4746500	85437000	148933	n/a	100 %
Laimennus ja sentrifugaus	22	12,32	271,0	1286250	28297500	104403	0,7	33 %
Anioninvaihto	20	2,07	41,4	110300	2206000	53285	0,4	2,6 %
Konsentroidi	5	5,01	25,1	296917	1484585	59265	0,4	1,7 %
Geelisuodatus	10	0,03	0,3	12230	122300	407667	2,7	0,14 %
Konsentroidi	0,55	0,76	0,42	119650	65808	157434	1,1	0,08 %

Taulukon 4 totaalitylavuus-sarakkeessa on kuvattu jokaisen yksittäisen prosessivaiheen jälkeinen lopputilavuus, jota on lähdetty puhdistamaan eteenpäin.

Taulukon aktiivisuudet soluhajotus-, sentrifugaus-, anioninvaihto- ja konsentroidivaiheeseen otettiin puskurinvaihdon jälkeisen TR-FIA-mittauksen tuloksista (Liite 4.) ja geelisuodatuksen ja viimeisen konsentroidivaiheen aktiivisuudet otettiin näiden vaiheiden jälkeisistä TR-FIA-mittauksista. Geelisuodatuksessa on huomioitu vain fraktio 22, koska kahdessa muussa jatkopuhdistetussa fraktiossa ei ollut proteiinia BCA-mittauksen perusteella.

Taulukon tulokset ovat hyvin esimerkinomaiset, koska eri puhdistusvaiheiden TR-FIA-mittaustuloksien välillä oli selviä eroja esim. postitiivisten kontrollien suuruudessa. Anioninvaihdon saantokin oli selvästi alhaisempi kuin taulukossa 2.

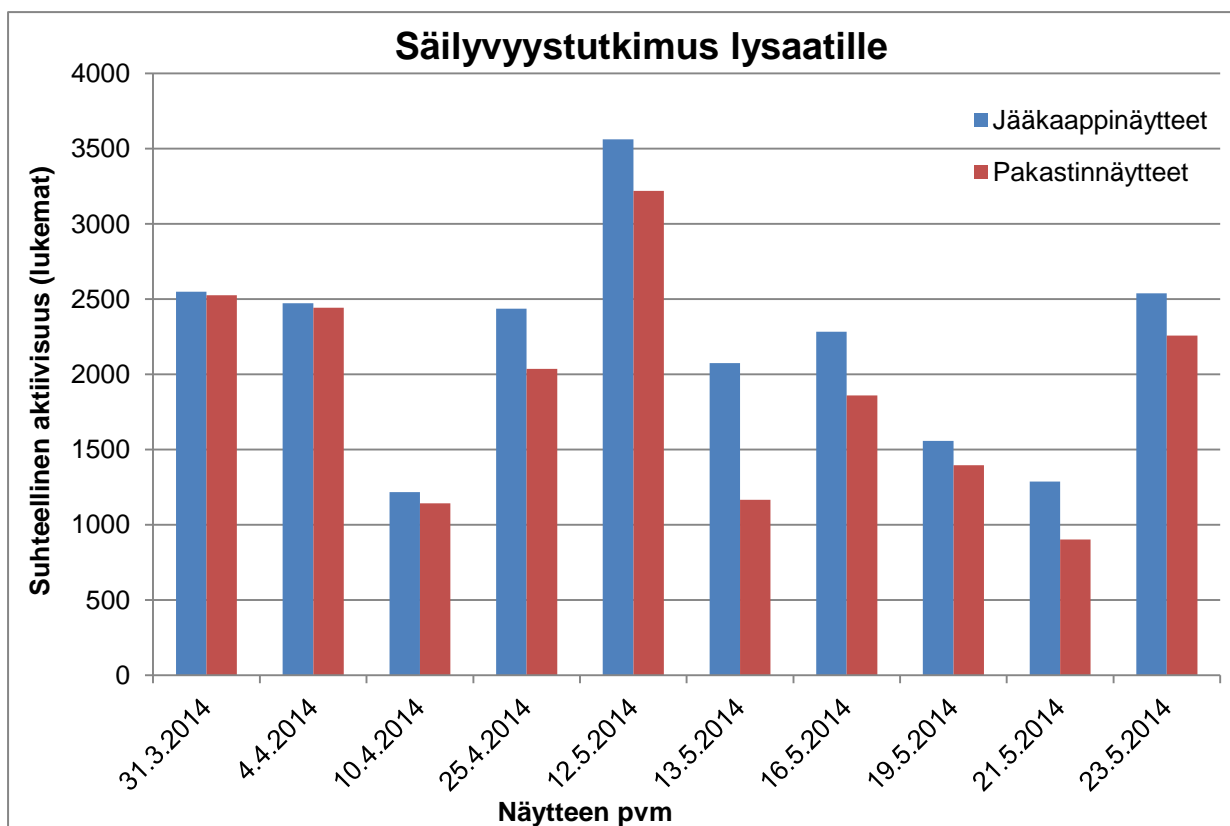
Taulukosta 4 voidaan todeta, että puhdistettavan InB-NP-saanto laski merkittävästi jo lyaatin sentrifugoinnissa. Anioninvaihdossa saanto laski vielä enemmän jo alle kolmeen prosenttiin. Anioninvaihdon jälkeisessä konsentroidinnissa saanto ei vielä romahtanut, mutta tätä seuranneessa geelisuodatuksessa saanto laski erittäin alhaiseksi (0,14 %). Geelisuodatuksen jälkeisessä viimeisessä

konsentroiduissa saanto laski edelleen noin puoleen geelisuodatukselta. Geelisuodatuksen kolmesta konsentroidusta fraktiosta vain yhdessä oli InB-NP:a TR-FIA-mittauksen perusteella. Fraktion InB-NP-konsentraatio nousi selvästi näytteessä, mutta spesifinen aktiivisuus kuitenkin laski, koska näytteen kokonaisproteiinimäärä oli noussut, minkä ei pitäisi olla mahdollista. InB-NP-kokonaismäärä oli myös laskenut. Kokonaisproteiinin määrän nousu selittyy todennäköisimmin mittausvirheestä, koska BCA-mittauksen kokonaisproteiinit olivat hyvin lähellä taustan arvoja.

Tarkasteltaessa koko prosessin etenemistä voidaan todeta, että puhdistusprosessia tulisi vielä kehittää. Esimerkiksi anioninvaihdossa eluution resoluutio ei ollut kovinkaan hyvä (Kuva 2.) Saanto laski puhdistusprosessin jokaisessa vaiheessa. Tästä tuleekin miettiä, onko proteiini mahdollisesti denaturoitunut puhdistuksessa tapahtuneiden olosuhdemuutoksien esim. lämpötilan muutoksien, pH:n muutoksien, suolakonsentraation tai puskuriolosuhteiden muutoksien takia.

#### 4.7 InB-NP:n säilyvyystutkimus lysaatista

Työssä tutkittiin kuinka soluhajotetun lysaatin InB-NP säilyy jääkaappi- tai pakastinsäilytyksessä. Säilyvyystutkimus tehtiin TR-FIA-mittauksen tulosten perusteella. Jokaisessa mittauksessa molempia näytteitä pipetoitiin samalla laimennoksella (1/100) yhtä monta rinnakkaista. Jääkaappi- ja pakastinnäytteet mitattiin aina kun jokin muu prosessin vaihe vaati mittausta. Näin mittauksille saatiin eri aikapisteet. Tulokset taulukoitiin ja niiden pohjalta tehtiin pylväskuvaaja.



Kuva 8. Säilyvyystutkimuksen tulokset.

Kuvan 8 siniset pylväät (vasemmanpuoleiset) kuvaavat jääkaappinäytteiden, ja punaiset pylväät (oikeanpuoleiset) pakastinnäytteiden TR-FIA-mittaustuloksia. X-akselilla on kuvattu näytteen päivämäärä ja y-akselilla TR-FIA-mittauksen tulokset. Testin lukemat on suhteutettu positiivisen kontrollin lukemiin.

Pylväiden TR-FIA-mittauslukemat on taulukoitu liitteessä 7. Eri TR-FIA-mittausten välillä positiivisten kontrollien lukemissa saattoi olla suuriakin eroja, jonka seurauksena jääkaappi- ja pakastinnäytteiden lukemat suhteutettiin saman mittauksen positiiviseen kontrolliin (Tokyo). Diagrammista voidaan huomata, että hajonta on melko suuri, koska mittauksien positiivisten kontrollien välillä oli suuria eroja. Toisaalta kuvasta voidaan todeta, että jääkaappinäytteillä on ollut jokaisessa mittauksessa korkeammat lukemat kuin pakastinnäytteillä. Tästä voidaan päätellä lysaatin säilyvän paremmin jääkaapin 4 °C:essä kuin pakastimen -18 °C:essä. Pakastinsäilytetyn näytteen alhaisemmat lukemat voivat selittyä sillä, että InB-NP-aktiivisuus kärsii pakastus-sulattamisesta.

## 5 JOHTOPÄÄTÖKSET

Työssä keskityttiin ioninvaihtokromatografiaan ja muita puhdistukseen liittyviä vaiheita kuten ultra- ja geelisuodatusta käytettiin jälkipuhdistuksessa. Työn alkuvaiheessa on esitetty useita eri ajoja, joista valittiin yksi tehtäväksi isommas-  
sa tilavuudessa. Isomman tilavuuden ajoissa ei käytetty optimaalisinta matriisia 1 ml testiajojen pohjalta, vaan työssä käytettiin toista matriisia kompromissina työjärjestykseen liittyvistä asioista. Jos työ tehtäisiin nyt uudestaan, pienten 1 ml kokoisilla pylväillä tehtyjen testiajojen perusteella kannattaisi kokeilla myös esimerkiksi Q Sepharose XL -matriisia pH 7-olosuhteissa (Taulukko 1.). Q Sepharose XL -matriisilla oli 1 ml testiajojen perusteella parempi sitomiskapasiteetti ja saanto kuin työssä käytetyllä Q Sepharose FF -matriisilla, mutta sitä ei ehditty käyttää isommassa mittakaavassa työn aikana.

Anioninvaihtoajon resoluutio ei ollut paras mahdollinen ajossa syntyneen kromatogrammin (Kuva 2.) perusteella. Piikit olivat melkoisen leveitä ja ne eivät erottuneet toisistaan kovinkaan hyvin. Resoluutiota voisi parantaa esimerkiksi kokeilemalla toisenlaisia gradientteja eluutiossa.

Eluutiogradienttina voisi käyttää mm. steppigradienttia, jossa puhdistettaisiin ensin heikoimmin kiinni olevat proteiinit määrättyllä alhaisella NaCl-konsentraatiolla, ja seuraavassa stepissä konsentraatio asetettaisiin suotuisaksi kohdeproteiinin irtoamisen kannalta. Viimeisenä steppinä suolakonsentraatio nostettaisiin niin ylös, että kovimmin kiinni olevat proteiinit irtoaisivat pylvästä. Toinen kokeilemisen arvoinen eluutiogradientti voisi olla pH-gradientti. pH-gradientissa eluution edetessä puskurin pH:ta muutetaan samalla periaatteella kuin suolagradientissa, mutta proteiinin irtoaminen matriisista perustuu absorboituneiden proteiinien pintavarauksen muuttumiseen pH:n muutoksesta ja sitä kautta proteiinin matriisista irtoamiseen. pH-gradientissa on kuitenkin suurempi vaara kohdeproteiinin aktiivisuuden menettämisestä mahdollisten rakenteellisten muutosten seurauksena.

Ioninvaihdossa aktiivisuus oli jakautunut melko tasaisesti kaikille eluutiopiikeille (Kuva 2.). Tämä voi selittyä sillä, että InB-NP ei ole tuottunut yhdenkokoisina fragmentteina, vaan kyseessä on ollut heterogeeninen populaatio. Erikokoisilla fragmenteilla on erilaiset pintavaraukset, jolloin suuremman negatiivisen pinta-varauksen omaavat fragmentit irtoavat myöhemmin eluutiossa suolakonsentraation noustessa.

Koska työhön käytettävä aika oli lyhyt, ainoassa suuremman mittakaavan anioninvaihdossa käytettiin vahvaa Q FF -matriisia, jossa matriisin ioninvaihtokapasiteetti ei muutu pH-olosuhteita muuttamalla. Vaikka ioninvaihtokapasiteetti ei muutukaan matriisissa, vahvoilla matriiseilla saatiin eri pH:lla erilaiset kromatogrammit ja saannot. Tämä selittyy todennäköisimmin sillä, että pH:ta muuttamalla kohdeproteiinin pintavaraukset muuttuvat, jolloin proteiini kiinnittyy vahvaankin matriisiin eri tavoin eri pH:issa. Seuraavaksi voitaisiin myös kokeilla heikkoa anioninvaihtajaa esimerkiksi DEAE FF tai ANX FF -matriisia, kuten taulukosta 1 voidaan huomata. Heikkoja matriiseja voisi myös kokeilla suuremmalla 20 ml pylväällä pH 7-olosuhteiden lisäksi pH 8 ja 9-olosuhteilla. pH 8 ja 9 -olosuhteissa matriisin ioninvaihtokapasiteetti nousisi pH 7-olosuhteisiin verrattuna, jolloin saavutettaisiin mahdollisesti parempi selektiivisyys tai saanto, tai molemmat.

Tarkasteltaessa koko puhdistusprosessin puhdistuskaaviota (Taulukko 4.), saannon huomataan laskevan erittäin alhaiseksi. Näytteen saanto oli laskenut 35 prosenttiin jo ensimmäisessä lyaatin käsittelyvaiheessa, eli sentrifugauksessa. Sentrifugauksessa käytettiin mahdollisesti liian kovaa voimaa, jolloin proteiiniaggregaatit saattoivat sakkautua putkien pohjalle muun roskan mukana. Toinen mahdollinen syy saannon laskuun sentrifugoinnissa saattaa olla soluhajotuksen tehottomuus. Kaikki solut eivät mahdollisesti menneet rikki solupräsissä, jolloin ehjät solut sakkasivat putkien pohjalle. Tämä on todennäköisin syy saannon laskuun sentrifugointivaiheessa. Parantamalla jo pelkästään soluhajotus- ja sentrifugausprosessia, aktiivista näytettä saataisiin paljon enemmän ioninvaihtojoihin.

Ioninvaihtoajossa saanto oli melko alhainen. Pelkän IEX-vaiheen saanto oli noin 33 % tai 9 % riippuen käytetäänkö taulukkoa 2 vai 3. Saannon lasku selittyy todennäköisimmin sillä, että kyseinen matriisi-pH-yhdistelmä (Q FF pH 7) ei sopinut InB-NP:n puhdistamiseen esimerkiksi riittämättömän varauseron tai olosuhdemuutoksien takia.

Ioninvaihdon jälkeisessä ultrasuodatuksessa saanto laski edelleen. Ultrasuodatuksessa kalvon huokoskoko ei ollut todennäköisesti ongelma, koska puhdistettava proteiini oli suurikokoisina aggregaatteina suodatettavassa liuoksessa. Suodatuksessa osa proteiinista saattoi esimerkiksi denaturoitua olosuhdemuutoksien takia puskurinvaihdossa. Ultrasuodatuksessa myös jäähdytys oli vaikea toteuttaa, minkä seurauksena lämpötilan vaihtelut saattoivat myös olla haitaksi kohdeproteiinille. Suodatuksen loppuvaiheessa muodostui myös vaahtoa, joka saattoi myös olla syynä saannon laskuun.

Ultrasuodatuksen jälkeisessä geelisuodatuksessa saanto ja InB-NP-määrät olivat niin alhaiset, että mittaustuloksia ja sitä kautta lopun puhdistumista on vaikeaa laskea tai arvioida tarkasti. Geelisuodatuksen kromatogrammista voidaan huomata, että erottumista eri proteiinien välillä ei juuri tapahdu, koska siinä on vain yksi selkeä proteiinia sisältävä piikki. Erottelukykyä voitaisiin saada paremmaksi, jos kokeiltaisiin matriisia, jossa helmien koko olisi pienempi. Esimerkiksi Sephacryl S-500 -matriisi pystyy erottelemaan pienempiä fragmentteja tehokkaammin kuin käytetty S-1000 -matriisi. Geelisuodatuksen jälkeisessä konsentroidussa kolmesta konsentroidussa fraktiosta vain yhdessä (fraktio 22) oli konsentroidun jälkeen InB-NP:a, mistä voidaan päätellä, että kohdeproteiini on eluoitunut kromatogrammin suurimmassa piikissä. Kahdessa muussa konsentroidussa fraktiossa ei ollut InB-NP:a.

Kaiken kaikkiaan työssä saatiin tietoa tuotetun Influenssa B -viruksen nukleo-proteiinin kromatografisen puhdistamiseen. Työn tulokset antavat tästä eteenpäin paremmat lähtöasetelmat puhdistusprosessin mahdolliselle jatkokehitykselle.

## LÄHTEET

- <sup>1</sup> Webster G, Bean W, Gorman O. etc. Evolution and Ecology of Influenza A Viruses. Microbiological reviews 1992. p.152-179. Vol. 56, No. 1.
- <sup>2</sup> Centers for Disease Control and Prevention. 2014. Types of Influenza Viruses. Viitattu 21.11.2014. <http://www.cdc.gov/flu/about/viruses/types.htm>.
- <sup>3</sup> Centers for Disease Control and Prevention. 2014. Antigenic Characterization. Viitattu 21.11.2014. <http://www.cdc.gov/flu/professionals/laboratory/antigenic.htm>.
- <sup>4</sup> Webster G, Bean W, Gorman O. etc. Evolution and Ecology of Influenza A Viruses. Microbiological reviews 1992. p.152-179. Vol. 56, No.
- <sup>5</sup> Nikkari S, Halonen P, Kharitonov I. etc. One-incubation time-resolved fluoroimmunoassay based on monoclonal antibodies in detection of influenza A and B viruses directly in clinical specimens. Journal of Virological Methods, 23 (1989) 29-39.
- <sup>6</sup> Geenipankki. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank>. Viitattu 28.11.2014.
- <sup>7</sup> Calculation of protein isoelectric point. <http://isoelectric.ovh.org/>. Viitattu 18.3.2014 ja 28.11.2014.
- <sup>8</sup> Wheelwright S. 1991. Protein Purification, Design and Scale up of Downstream Processing. John Wiley & Sons Inc. s.154-156 ja 194-200.
- <sup>9</sup> Bonner P. 2007. Protein purification. Taylor & Francis Group. s. 79-82 ja 121-127.
- <sup>10</sup> Handbooks from GE Healthcare. Ion Exchange Chromatography & Chromatofocusing, Principles and Methods. 11-0004-21.
- <sup>11</sup> Handbooks from GE healthcare. Size Exclusion Chromatography. Principles and methods. 18-1022-18.
- <sup>12</sup> Amersham pharmacia biotech. Instructions. Gel Filtration Calibration Kits. High Molecular Weight & Low Molecular Weight.



## InB-NP:n aminohapposekvenssi massaspektrometriajon pohjalta

MRFPSIFTAVLFAASSALAAPVNTTTEDETAQIPAEAVIGYSDLEGDFDVAVLPFSNST  
NNGLLFINTTIAASIAAKEEGVSLEKREAEAMSNMDIDGINTGTIDKTPEEITSGTSGTTRP  
IIRPATLAPPSNKRTRNPSPERATTSSEDDVGRKTQKKQTPTEIKKSVYNMVVKLGEF  
YNQMMVKAGLNDDMERNLIQNAHAVERILLAATDDKKTEFQKKKNARDVKEGKEEID  
HNKTGGTFYKMVRDDKTIYFSPIRITFLKEEVKTMKYTTMGSDGFSGLNHIMIGHSQM  
NDVCFQRSKALKRVGLDPSLISTFAGSTVPRRSGATGVAIKGGGTLVAEAIRFIGRAM  
ADRGLLRDIKAKTAYEKILLNLKNKCSAPQQKALVDQVIGSRNPGIADIEDLTLLARSMV  
VVRPSVASKVVLPISIYAKIPQLGFNVEEYSMVGYEAMALYNMATPVSILRMGDDAKD  
KSQLFFMSCFGAAYEDLRVLSALTGTETFKPRSALKCKGFHVPAGEQVEGMGAALMSI  
KLQFWAPMTRSGGNEVGGDGGSGQISCSPVFAVERPIALSKQAVRRMLSMNIEGRD  
ADVKGNNLLKMMNDSMAKKTSGNAFIGKKMFQISDKNKTNPIEIPKQTIPNFFFGRDTA  
EDYDDL DYL AENLYFQGGGGSGGGSGGGSSNGNGNVCPPGLFSNPQCCATQVLGL  
IGLDCKVPSQNVYDGTDFRNVCAKTGAQPLCCVAPVAGQALLCQTAVGAWSHPPQFE  
KHHHHHHDEL

Aminohapposekvenssi oli saatu massaspektrometrillä Turun yliopistossa. Aminohapposekvenssin avulla saatiin laskennallinen pl puhdistettavalle proteiinille. Laskennalliseksi pl:ksi saatiin siis pH 8 ja molekyyli­massaksi noin 82 500 Da.

## BCA-mittaustulokset

Kokonaisprot.- konsentraatio (mg/ml)	Näyte
31,87	Hajotettu lyaatti
12,32	Ioninvaihdon lähtönäyte
2,07	Ioninvaihdon yhdistetyt parhaat fraktiot
5,01	UF Konsentraatti
0,03	GF fraktio 22
0	GF fraktio 39
0	GF fraktio 40
1,39	GF fraktio 22 konsentroitu
0	GF fraktio 39 konsentroitu
0	GF fraktio 40 konsentroitu

Taulukon tuloksissa eri näytteiden laimennokset on otettu huomioon. Mittauksessa standardisuorana käytettiin BSA-standardia kahdeksalla konsentraatiopisteellä välillä 0,025 – 1,5 mg/ml. Ioninvaihdon arvot ovat suuremman mittakoon ajosta.

## 20 ml pylvään anioninvaihtoajon TR-FIA-mittaustulokset

Counts – tausta	*laimennos	Näyte/fraktio	Näyte / (laimennos)
953,5		MB	Multibuffer (tausta)
22374,5	2237450	Tokyo	Pos. kontrolli (1/100)
5105,5	510550	Lysaatti	Hajotettu lysaatti (1/100)
2687	134350	Alku pH 7	Alkunäyte pH 7 (1/50)
3281,5	32815	f 3	Ajon fraktiot 3-6 ja 15-35 (1/10)
1056	10560	f 4	
708	7080	f 5	
484	4840	f 6	
137	1370	f 15	
437,5	4375	f 16	
583,5	5835	f 17	
975,5	9755	f 18	
973	9730	f 19	
1304,5	13045	f 20	
1580,5	15805	f 21	
1748,5	17485	f 22	
1541,5	15415	f 23	
1336	13360	f 24	
928	9280	f 25	
929,5	9295	f 26	
968	9680	f 27	
992	9920	f 28	
1015	10150	f 29	
840	8400	f 30	
446	4460	f 31	
364,5	3645	f 32	
319,5	3195	f 33	
516	5160	f 34	
473	4730	f 35	

Taulukon ensimmäisen sarakkeen tulokset ovat kahden rinnakkaisen mittauksen keskiarvo, josta on vähennetty tausta, eli Multibuffer-puskuri.

## Konsentroinnin TR-FIA-mittaustulokset

Counts – tausta	*laimennos	Näyte/ fraktio	Näyte / (laimennos)
1020	1020	MB	Multbuffer
30472,5	3047250	Tokyo	Pos. kontrolli (1/100)
4746,5	474650	Lysaatti	Hajotettu lysaatti (1/100)
1103	11030	Lähtö yhdistetty	Lähtönäyte yhdistetyistä IEX-ajon fraktioista (1/10)
73	0	Permeaatti	Permeaatti Tris (1/10)
675	33750	Kons.	Konsentroituu (1/50)
335,5	33550	Kons.	Konsentroituu (1/100)
2177,5	21775	Kons.	Konsentroituu (1/10)
2572,5	128625	Lähtö IEX	Lähtönäyte IEX-ajo (1/50)
58	0	Permeaatti	Permeaatti PBS (1/10)

Taulukon ensimmäisessä sarakkeessa on rinnakkaisten mittausten keskiarvo, josta on vähennetty myös tausta. Toisessa sarakkeessa on laskettu laimennos pois.

## Geelisuodatuksen TR-FIA-mittaustulokset

Counts - tausta	*laimennos	counts/ml	fraktio	Näyte / (laimennos)
1099	1099		Tausta	Tausta AB
33307	3330725	33307250	Tokyo	Pos. kontrolli (1/100)
1600	160025	1600250	Victoria	Pos. kontrolli (1/100)
4283	428325	4283250	Lysaatti	Hajotettu lysaatti (1/100)
375	18738	187375	Lähtö	Lähtönäyte kons. (1/50)
1838	18378	183775	Lähtö	Lähtönäyte kons. (1/10)
67	673	ei alueella	GF - 15	GF fraktiot 15-42 (1/10)
136	1358	ei alueella	GF - 16	
60	598	ei alueella	GF - 17	
-55		ei alueella	GF - 18	
-13		ei alueella	GF - 19	
21		ei alueella	GF - 20	
18		ei alueella	GF - 21	
122	1223	12225	GF - 22	
94	943	9425	GF - 23	
57	573	5725	GF - 24	
6		ei alueella	GF - 25	
-35		ei alueella	GF - 26	
86	858	8575	GF - 27	
84	838	8375	GF - 28	
5		ei alueella	GF - 29	
11		ei alueella	GF - 30	
-73		ei alueella	GF - 31	
-68		ei alueella	GF - 32	
-12		ei alueella	GF - 33	
38		ei alueella	GF - 34	
49	493	ei alueella	GF - 35	
-8		ei alueella	GF - 36	
-15		ei alueella	GF - 37	
-19		ei alueella	GF - 38	
204	2038	20375	GF - 39	
169	1693	16925	GF - 40	
40		ei alueella	GF - 41	
-14		ei alueella	GF - 42	

## Viimeisen konsentroinnin TR-FIA-mittaustulokset

Counts - tausta	*laimennos	Counts/ml	fraktio	Näyte / (laimennos)
1038			Tausta	Tausta AB
19094	1909350	19093500	Tokyo	Pos. kontrolli (1/100)
4502	450150	4501500	Victoria	Pos. kontrolli (1/100)
4846	484550	4845500	Lysaatti	Hajotettu lysaatti (1/100)
1197	11965	119650	f 22	f 22 (1/10)
13	125	ei alueella	f 39	f 39 1/10)
85	845	ei alueella	f 40	f 40 (1/10)
58	580	ei alueella	f 22 perm.	f 22 permeaatti
149	1485	ei alueella	f 39 perm.	f 39 permeaatti
108	1075	ei alueella	f 40 perm.	f 40 permeaatti

Ensimmäisessä sarakkeessa on rinnakkaisten mittaustulosten keskiarvot, joista on vähennetty tausta. Toisessa sarakkeessa eri näytteiden laimennokset on huomioitu. Counts/ml-sarakkeessa on laskettu kuinka paljon lukemaa on yhdessä millilitrassa eli \*laimennos-sarakkeen arvo kerrotaan vielä kymmenellä, koska TR-FIA-mittauksessa on 100 µl:n näyte.

## TR-FIA-mittaustulokset lyaatin säilyvyystutkimukselle

Pvm	JK/Tokyo	JK	PK/Tokyo	PK	Tokyo (+)	MB (tausta)
31.3.2014	0,2548	2548	0,2525	2525	91958	1230
4.4.2014	0,2472	2472	0,2443	2443	64240	933
10.4.2014	0,1216	1216	0,1141	1141	57938	1085
25.4.2014	0,2435	2435	0,2036	2036	32097	1805
12.5.2014	0,3560	3560	0,3218	3218	14855	1163
13.5.2014	0,2073	2073	0,1166	1166	31062	1178
16.5.2014	0,2282	2282	0,1860	1860	22375	954
19.5.2014	0,1558	1558	0,1395	1395	30473	1020
21.5.2014	0,1286	1286	0,0901	901	33307	1099
23.5.2014	0,2538	2538	0,2256	2256	19094	1038

JK tarkoittaa jääkaappi- ja PK pakastinnäytettä. Taulukossa sarakkeet JK/Tokyo ja PK/Tokyo kuvaavat jääkaappi- ja pakastinnäytteen suhdetta positiiviseen kontrolliin (Tokyo). Syntynyt suhdeluku kerrotaan sen jälkeen JK- tai PK-näytteen lukemilla, jolloin lukemia voidaan verrata toisiinsa.